Facultad de Farmacia

Escuela de Química y Farmacia

Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular

EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE BIST23, UN POTENCIADOR DE LAS DINAMINAS, SOBRE LA FUNCIÓN COGNITIVA Y DENSIDAD DE ESPINAS DENDRÍTICAS EN NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATONES 3xTg, MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Unidad de Investigación II para optar al Título de Químico Farmacéutico

Maira Malén Munizaga Saavedra

Directora: Arlek González-Jamett

Co-Directora: Barbara Gómez-Soto

2025

Dedicado a mis padres Silvia y Guillermo, por ser el pilar fundamental en mi vida.
A ustedes, que me dieron todo sin pedir nada, les dedico con el alma este fruto de tantos años de esfuerzo.

Dedicado a mi prometido Daniel, a ti, mi amor, compañero de este camino, confidente incansable y apoyo incondicional.
Este logro también lleva algo de ti, y por ello, te dedico estas páginas con sincero amor.

Dedicado a mi equipo de LAFINEM, por ser un apoyo fundamental en esta última etapa de mi carrera universitaria, entregándome todas las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto.

Con todo mi amor y gratitud, les dedico esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres:
Ustedes han sido mi fuerza en los días difíciles y mi mayor inspiración para seguir adelante.
Gracias por cada sacrificio que hicieron, por cada palabra de aliento, por cada gesto de amor.
Por enseñarme el valor del esfuerzo, la perseverancia y la humildad.
Por creer en mí incluso cuando yo dudaba.
Esta tesis es más que un logro académico; es un testimonio de todo lo que me han dado, de los valores que me han inculcado, y del amor que me ha sostenido en cada paso.

A Daniel y Milo:
Daniel, tu paciencia, tus palabras de aliento y tu fe en mí, fueron la fuerza que me impulsó a seguir adelante cuando más lo necesitaba. Gracias por estar presente incluso en la distancia, por comprender mis silencios, respetar mis tiempos, y recordarme de lo que soy capaz.
A mi bebé perruno, por regalarme su alegría incondicional, sus miradas llenas de ternura y esa compañía silenciosa que tantas veces me reconfortó mientras escribía estas páginas.
Esta tesis no solo es un logro académico, sino también una prueba de lo que somos capaces de construir juntos, como equipo, como familia.

A mi profesora guía, Arlek González-Jamett:
Agradezco por su paciencia, su compromiso, su rigurosidad científica, su constante disposición para guiarme y su fe en mi trabajo, que fueron esenciales para que este proyecto pudiera tomar forma y culminar favorablemente.
Gracias por fomentar en mí el pensamiento crítico, la curiosidad investigativa y el respeto por el conocimiento; y por darme la confianza de formar parte del maravilloso equipo de LAFINEM.
Su ejemplo como académica y como persona ha dejado una huella duradera en mi formación.

A Bárbara Gómez-Soto:
Expreso mi más sincero agradecimiento a mi co-directora de tesis por su orientación, constante dedicación y compromiso a lo largo del desarrollo de este proyecto.
Agradezco profundamente su apoyo, su paciencia, su tiempo, sus observaciones oportunas y su confianza en mi proceso formativo, que han contribuido a mi crecimiento tanto profesional como personal.

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por deterioro cognitivo progresivo y pérdida sináptica, siendo esta última una alteración temprana clave en la patología. Un modulador de la densidad y función sináptica en el cerebro mamífero son las dinaminas, éstas son GTPasas capaces de remodelar membranas y citoesqueleto, favoreciendo la morfogénesis de neuritas y espinas en neuronas del sistema nervioso. En la EA se ha descrito que las dinaminas disminuyen su expresión, lo que sugiere que la modulación positiva de su actividad podría tener efectos protectores contra los signos tempranos de la EA.

El presente estudio evaluó el impacto de la administración intranasal de BIST23, un potenciador de la actividad de las dinaminas en ratones 3xTg modelo de EA, y controles WT silvestres (wildtype). Mediante el test de Morris Water Maze (LAM) se evaluó memoria espacial y mediante el test de reconocimiento de objetos nuevos (NOR) se analizó memoria de reconocimiento. Además, se analizó la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales en rebanadas cerebrales teñidas con Golgi-Cox.

Los resultados conductuales mostraron que los animales 3xTg presentaron déficits en tareas de memoria espacial y reconocimiento, en comparación con los grupos WT. Si bien el tratamiento con BIST23 no logró prevenir de manera significativa estos déficits, se observó una tendencia a un aumento en el rendimiento del grupo 3xTg tratado con BIST23. A nivel sináptico, se observó una disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas en los animales 3xTg tratados con VEH, reflejando una pérdida sináptica asociada a la progresión de la EA. En los animales 3xTg tratados con BIST23 se previno este efecto.

En conjunto, estos resultados sugieren que BIST23 podría modular positivamente la estructura sináptica en condiciones neurodegenerativas y representar una estrategia terapéutica potencial para la EA. La vía intranasal demostró ser eficiente para la administración del compuesto. En el futuro se requerirán más estudios para confirmar su eficacia funcional y explorar mecanismos implicados.

Effect of Intranasal Administration of BIST23, a Dynamin Enhancer, on Cognitive Function and Dendritic Spine Density in Hippocampal Neurons of 3xTg Mice, a Murine Model of Alzheimer's Disease.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive cognitive decline and synaptic loss, the latter being a key early alteration in its pathology. A modulator of synaptic density and function in the mammalian brain is dynamins, which are GTPases capable of remodeling membranes and the cytoskeleton, thereby promoting neurite and spine morphogenesis in neurons of the nervous system. In AD, dynamins have been reported to show reduced expression, suggesting that positively modulating their activity could have beneficial effects on the early signs of the disease.

The present study evaluated the impact of intranasal administration of BIST23, a dynamin activity enhancer, in 3xTg mice, a model of AD, and in wild-type (WT) control mice. Spatial memory was assessed using the Morris Water Maze (MWM) test, and recognition memory was analyzed through the Novel Object Recognition (NOR) test. Additionally, the dendritic spine density in hippocampal neurons was analyzed in brain slices stained with Golgi-Cox.

Behavioral results showed that 3xTg mice exhibited defects in both spatial and recognition memory tasks compared to WT groups. Although BIST23 treatment did not significantly prevent these deficits, there was a trend toward improving the performance in the 3xTg group treated with BIST23. At the synaptic level, a significant decrease in dendritic spine density was observed in 3xTg animals treated with VEH, reflecting synaptic loss associated with AD progression. Remarkably, in 3xTg mice treated with BIST23, this loss of synaptic density was prevented.

Taken together, these findings suggest that BIST23 may positively modulate synaptic structure under neurodegenerative conditions and represent a potential therapeutic strategy for AD. The intranasal route proved to be efficient for compound administration. Further studies will be required to confirm its functional efficacy and explore the underlying mechanisms.

GLOSARIO

- **Amiloidosis:** es causada por la acumulación de péptido beta amiloide (Aβ) en el cerebro, lo que provoca toxicidad neuronal en el sistema nervioso central (SNC). Las anomalías extracelulares de los niveles de Aβ en el cerebro pueden conducir a la acumulación de Aβ y formar oligómeros que se recombinan en fibrillas formando placas amiloides (Ma et al., 2022).
- **BIST23:** es una tirosina dimérica que promueve la oligomerización de dinamina dependiente de la actina y, por lo tanto, aumenta la polimerización de actina (Schiffer et al., 2015).
- **Citoesqueleto neuronal:** es una red de proteínas estructurales, que comprende tres complejos distintos que interactúan y tienen propiedades muy diferentes: microtúbulos (MT), neurofilamentos (NF) y microfilamentos (MF). Cada uno tiene una composición, estructura y organización características que pueden especializarse aún más en un tipo de célula o dominio subcelular particular (Kirkpatrick & Brady, 1999).
- **Dinaminas:** son GTPasas grandes (100 kDa) y actúan como mecano-enzimas moduladoras del citoesqueleto de actina y microtúbulos. Forman un anillo helicoidal en los sitios de invaginación de la membrana aumentando su actividad GTPasa, lo que posteriormente ayuda a la liberación de la carga encapsulada al interior de la célula, un paso crítico en la endocitosis (Arriagada-Diaz et al., 2020; Gundu et al., 2022).
- **Enfermedad de Alzheimer:** es una de las principales causas de demencia, es un trastorno neurodegenerativo progresivo. La demencia incluye pérdida de memoria y dificultades con el pensamiento, el lenguaje y las habilidades para resolver problemas (Khan et al., 2020).
- **Espinas dendríticas:** son diminutas protuberancias que emergen de las neuritas en neuronas excitatorias del sistema nervioso central, reciben información sináptica y compartimentan las respuestas postsinápticas. Heterogéneas en tamaño y forma, y modificables por la actividad y la experiencia, se ha considerado durante mucho tiempo que las espinas dendríticas proporcionan una base morfológica para la plasticidad sináptica (Hering & Sheng, 2001).

- **Plasticidad sináptica:** la capacidad de la actividad neuronal generada por una experiencia para modificar la función del circuito neuronal y, por lo tanto, modificar los pensamientos, sentimientos y comportamientos subsiguientes (Citri & Malenka, 2008).
- **Polimorfismo genético:** es una variante genética en la secuencia del ADN entre individuos de la misma especie y que se encuentra con una frecuencia superior al 1%. Un polimorfismo puede no tener ningún efecto por localizarse en una región no codificante del ADN, pero si se encuentra en una región codificante puede tener consecuencias en el fenotipo (Eugenomic, 2020).
- **Taupatías:** son enfermedades neurodegenerativas, clínica, bioquímica y morfológicamente heterogéneas, caracterizadas por el depósito de tau (unidad asociada a la tubulina) anormal, también llamada proteína tau asociada a los microtúbulos (MAPT), en el cerebro (Kovacs, 2017).

ABREVIACIONES

- APP: Proteína precursora Aβ.
- ApoE: Apolipoproteína E.
- BACE-1: β-secretasa.
- BHE: Barrera hematoencefálica.
- CICUAL: Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso.
- CRHUV: Clínica de Reproducción Humana de la Universidad de Valparaíso.
- Dyn-2: Dinamina-2.
- EA: Enfermedad de Alzheimer.
- EOFAD: Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano.
- GED: dominio efector de la actividad GTPasa.
- IP: intraperitoneal.
- LAFINEM: Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular de la Universidad de Valparaíso.
- LAM: Laberinto acuático de Morris.
- LOAD: Enfermedad de Alzheimer esporádica de inicio tardío.
- MF: microfilamentos.
- MT: microtúbulos.
- NF: neurofilamentos.
- NFTs: Ovillos neurofibrilares.
- NOR: Prueba de reconocimiento de objetos nuevos.
- OFT: Prueba de campo abierto.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- ON: objeto nuevo.
- PH: Dominio de homología de pleckstrina.

- PHF: Filamentos helicoidales apareados.
- PSEN1: Presenilina 1.
- PSEN2: Presenilina 2.
- SEM: error estándar de la media.
- SNC: sistema nervioso central.
- WT: Silvestre (Wild-type).

ÍNDICE

1. **Introducción**.....12
    1.1 Enfermedad de Alzheimer en la actualidad.....12
    1.2 Factores de riesgo asociados a la EA.....12
    1.3 Neuropatología de la EA.....13
        1.3.1) Acumulación amiloide como mecanismo patológico en la EA.....13
        1.3.2) Hiperfosforilación de tau.....14
    1.4 Citoesqueleto neuronal y su rol en la pérdida de sinapsis funcionales en la EA.....14
    1.5 Las dinaminas en el contexto de la EA.....15
    1.6 BIST23 y su efecto sobre las dinaminas.....16
2. **Hipótesis**.....18
3. **Objetivos**.....19
4. **Diseño experimental y metodología**..... 20
    4.1 Tipo de diseño.....20
    4.2 Descripción de la población de estudio.....20
    4.3 Muestreo y tamaño muestral.....20
    4.4 Variables.....20
    4.5 Tratamiento farmacológico.....21
    4.6 Pruebas conductuales.....21
        4.6.1) Prueba de campo abierto.....21
        4.6.2) Prueba de reconocimiento de objetos nuevos.....22
        4.6.3) Laberinto acuático de Morris.....22
    4.7 Estudios histológicos.....24
        4.7.1) Técnica de Golgi-Cox.....24
        4.7.2) Análisis morfométrico de espinas dendríticas.....25
    4.8 Análisis estadístico.....25
5. **Resultados**.....26
    5.1 Efecto de la administración intranasal de BIST23 en la conducta de ratones 3xTg y WT Estudios conductuales.....26
        5.1.1) Test de OF.....26
        5.1.2) Test de NOR.....27
        5.1.3) Prueba de LAM.....27

5.2 Efecto de la administración intranasal de BIST23 sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas 3xTg y WT……..……..…….28
5.2.1) Morfología neuronal en el hipocampo……..……..……28
5.2.2) Densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales teñidas con Golgi-Cox……..….29
6. **Discusión**……...……..……32
6.1 Memoria y capacidad cognitiva…….……..…32
6.2 Efecto de BIST23 sobre la densidad de espinas dendríticas……..……..……33
6.3 Administración de BIST23 intranasal v.s intraperitoneal……..……..35
7. **Conclusiones**……...…36
8. **Referencias**…….…….37
9. **Anexos**…….……...…..44

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Alzheimer en la actualidad.

El envejecimiento global de la población, el aumento en la longevidad y en la esperanza de vida han llevado a un crecimiento sostenido de la prevalencia de enfermedades crónicas y a una mayor acumulación de problemas de salud en etapas más avanzadas de la vida. Dentro de las enfermedades crónicas más prevalentes se encuentran los trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Garre-Olmo, 2018).

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo heterogéneo de enfermedades que se caracterizan por una disminución gradual, progresiva y selectiva de las funciones del sistema nervioso (Alarcón-Aguilar et al., 2019).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente más de 55 millones de personas padecen de algún tipo de demencia, siendo la EA la forma más común, abarcando entre el 60 y 80% de los casos (Alzheimer's Association, 2024). En Chile, la prevalencia de las demencias tipo Alzheimer alcanza una tasa del 3,97, es decir, que aproximadamente 4 de cada 1000 habitantes padecen EA según el Instituto Nacional de Estadísticas (INE, 2024).

1.2 Factores de riesgo asociados a la EA.

Entre los factores que aumentan el riesgo de sufrir algún tipo de demencia destacan: la edad avanzada, hipertensión arterial, trastornos metabólicos (diabetes, exceso de peso u obesidad), tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, inactividad física, aislamiento social y/o depresión, entre otros (World Health Organization, 2023).

Después de la edad avanzada, los antecedentes familiares son el segundo factor de riesgo más importante para el Alzheimer (Tanzi, 2012). La EA se considera una enfermedad genéticamente dicotómica que se presenta en dos formas: casos familiares de inicio temprano (EOFAD) generalmente caracterizados por herencia mendeliana (transmisión autosómica dominante), y la EA esporádica de inicio tardío (LOAD), que se define como una enfermedad multifactorial para la cual no existen causales genéticas asociadas (Bertram & Tanzi, 2005).

La EOFAD se presenta con edades de inicio menores de 65 años, y es causada por más de 160 mutaciones en 3 genes que incluyen: la proteína precursora amiloide (APP), presenilina 1 (PSEN1) y presenilina 2 (PSEN2). El gen que muta con mayor frecuencia, PSEN1, es responsable de la mayoría de los casos de EA que aparecen antes de los 50 años (Qin et al., 2020). Si bien, estas mutaciones que causan EA se producen en 3 genes diferentes, todas comparten una ruta bioquímica común: la producción alterada de péptido amiloide β (Aβ) que conduce a una sobreabundancia relativa de las formas neurotóxicas de Aβ (42 residuos), lo que finalmente resulta en muerte neuronal y demencia (Bertram & Tanzi, 2005).

Por otra parte, la LOAD que comienza a los 65 años o más, representa la gran mayoría de los casos de EA, y está asociada con polimorfismos genéticos que parecen operar como factores de riesgo y/o modificadores genéticos. Dentro de los modificadores genéticos, se ha establecido como factor de riesgo polimorfismos en el alelo ε4 del gen de la apolipoproteína E (ApoE) (Bertram & Tanzi, 2005). El gen ApoE, ubicado en el cromosoma 19, está involucrado en la producción de una proteína que ayuda a transportar colesterol y otros tipos de lípidos en el torrente sanguíneo (National Institute on Aging, 2024). Se trata de un gen polimórfico con tres alelos conocidos: ε2 , ε3 y ε4 , los cuales se heredan de manera codominante.

Cada alelo codifica para una proteína: (1) ApoE ε2, que puede proporcionar cierta protección contra la enfermedad; (2) ApoE ε3, el alelo más común, se cree que tiene un efecto neutro sin influir sobre el riesgo de padecer EA; y (3) ApoE ε4 que aumenta el riesgo y se asocia con una aparición más temprana de la enfermedad en ciertas poblaciones (Martínez et al., 2022). Aunque se ha confirmado que ApoE ε4 es un factor de riesgo para la EA, ésta sólo está presente en el 20-30% de la población general, esto significa que el riesgo puede variar entre personas de distinta ascendencia (National Institute on Aging, 2024).

Otro punto importante de considerar es que, junto con el gen ApoE, en el cromosoma 19 también está ubicado el **gen *DNM2* que codifica para la proteína dinamina 2**, la cual está implicada en el remodelamiento de membranas y del citoesqueleto, controlando procesos celulares como la endocitosis, exocitosis y polimerización de actina y tubulina (Arriagada-Diaz et al., 2020). Interesantemente, se han identificado polimorfismos de nucleótido único en el gen *DNM2* en pacientes con EA que afectan la función de dinamina 2 (Aidaralieva et al., 2008), **lo que sugiere que alteraciones en *DNM2* podrían contribuir a los factores de riesgo implicados en la EA**.

1.3 Neuropatología de la EA

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por cambios neuropatológicos degenerativos progresivos, con un deterioro global asociado al funcionamiento cognitivo y la personalidad. La secuencia patológica comienza mayoritariamente en las estructuras del lóbulo temporal medial, involucrado en la consolidación de la memoria y luego progresa a las áreas frontal, temporal y parietal, con preservación relativa de las regiones motoras, corticales sensoriales y subcorticales (Cabrera et al., 2014). La neuropatología de la EA es muy compleja y aún no están totalmente esclarecidos todos los mecanismos patológicos involucrados, aunque existen diversas hipótesis que intentan explicar estos procesos.

1.3.1 Acumulación amiloide como mecanismo patológico en la EA

Esta hipótesis sostiene que la formación de placas amiloides en la EA se debe a la sobreproducción de formas insolubles del péptido Aβ (Breijyeh & Karaman, 2020). La patogénesis comienza con un procesamiento alterado de la APP, que normalmente se escinde por la acción de las α-secretasas para producir péptidos no amiloidogénicos. Sin embargo, existe otra ruta a través de las β-secretasas (BACE-1) y γ-secretasas, se producen formas amiloides insolubles del Aβ, altamente neurotóxicas. Las enzimas PSEN1 y PSEN2 son parte del complejo γ-secretasa encargado del procesamiento de la APP, y tal cómo se mencionó anteriormente, mutaciones en PSEN1 se asocian con una aparición temprana de la EA y un aumento de Aβ neurotóxico (López, 2001).

El Aβ tiene propiedades bioquímicas que favorecen su agregación en oligómeros insolubles y protofibrillas, que a su vez forman placas amiloides. Estos procesos, junto con una eliminación insuficiente de Aβ del cerebro, conducen a la acumulación extracelular de Aβ y la posterior activación de cascadas neurotóxicas que finalmente provocan cambios citoesqueléticos, disfunción neuronal y muerte celular (De-Paula et al., 2012) (Figura N°1).

La inflamación es un efecto secundario importante de los depósitos de Aβ, caracterizado por la activación de células gliales y la producción de mediadores inflamatorios que inducen neurotoxicidad, incluyendo especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (Cabrera et al., 2014). Además, el Aβ puede alterar la función de varios receptores neuronales, como los involucrados en la transmisión colinérgica y los receptores de glutamato NMDA y AMPA, afectando la plasticidad sináptica excitatoria (Carvajal, 2016; Overk & Masliah, 2014).

Diversos estudios sugieren que los agregados insolubles del péptido Aβ parecen activar a quinasas encargadas de fosforilar a la proteína de asociación a microtúbulos Tau, tales como GSK3β, CDK5, FAK1 y Fyn quinasa (Overk & Masliah, 2014), lo que favorecería la hiperfosforilación y agregación de Tau (Figura N°1).

1.3.2 Hiperfosforilación de Tau

Los ovillos neurofibrilares (NFTs del inglés *neurofibrillary tangles*) son filamentos anormales de la proteína de asociación a microtúbulos Tau hiperfosforilada, algunas etapas puede enrollarse entre sí para formar filamentos helicoidales (PHF) y acumularse en el citoplasma neuronal, los axones y las dendritas neuronales, lo que provoca una pérdida de microtúbulos citoesqueléticos y proteínas asociadas a la tubulina en las neuronas, conduciendo a la neurodegeneración típica de la EA (Breijyeh & Karaman, 2020).

La proteína Tau hiperfosforilada es el principal constituyente de los NFTs en el cerebro de pacientes con EA, y su evolución puede reflejar las etapas morfológicas de los NFTs, que incluyen: (1) antes de enrollarse, donde las proteínas Tau fosforiladas se acumulan en el compartimento somatodendrítico sin la formación de PHF, (2) NFT maduros, que se caracterizan por la agregación de filamentos de proteína Tau con el desplazamiento del núcleo a la parte periférica del soma, y (3) los ovillos extracelulares, que resultan de una pérdida neuronal debido a grandes cantidades de proteína Tau filamentosa con resistencia parcial a la proteólisis (Breijyeh & Karaman, 2020).

La desestabilización de microtúbulos y del citoesqueleto de actina en las neuronas en el contexto de la EA, parece ser un mecanismo patológico en etapas tempranas de la patología que afecta la estructura y función sináptica, conduciendo a la pérdida de sinapsis funcionales en la EA (Dorostark et al., 2015; Pelucchi et al., 2020).

1.4 Citoesqueleto neuronal y su rol en la pérdida de sinapsis funcionales en la EA

El citoesqueleto neuronal está compuesto de microtúbulos (MT), filamentos de actina y filamentos intermedios (Kevenaar & Hoogenraad, 2015). Los filamentos de actina, son particularmente relevantes para el recambio dinámico de estructuras sinápticas clave como las espinas dendríticas y terminales axonales, los cuales constituyen los principales sitios de contacto sináptico en los cerebros de las especies mamíferas (Pelucchi et al., 2020). Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias ricas en actina filamentosa (F-actina) en la superficie de las dendritas neuronales, cuya plasticidad morfológica y molecular desempeña un papel clave en los mecanismos que determinan funciones cerebrales superiores como el aprendizaje y la memoria. Tanto la forma como la función de las espinas dependen críticamente del citoesqueleto de actina (Dent et al., 2011).

Cambios en el número y tamaño de espinas dendríticas se asocian con cambios en la “eficiencia” de la transmisión sináptica, fenómeno conocido como plasticidad sináptica y neuronal. La plasticidad sináptica se refiere específicamente a la modificación dependiente de la actividad de la fuerza o eficacia de la transmisión sináptica, y se ha propuesto que desempeña un papel central en la capacidad del cerebro para incorporar experiencias transitorias en rastros persistentes de memoria (Citri & Malenka, 2008).

Los mediadores moleculares que regulan la polimerización, despolimerización y estabilización de F-actina son, por lo tanto, actores relevantes para facilitar los procesos de ensamblaje, desensamblaje y reorganización del citoesqueleto, que son críticos para la plasticidad sináptica y neuronal (Stefen et al., 2016). Sin embargo, las señales que limitan la plasticidad sináptica también

afectan al citoesqueleto (Gordon-Weeks & Fournier, 2014), disminuyendo la densidad y el tamaño de espinas dendríticas, causando pérdida de sinapsis funcionales (Breijyeh y Karaman, 2020; Lamprecht, 2021) y finalmente afectando la conectividad y función neuronal, lo que contribuye a la neurodegeneración en la EA (Stefen et al., 2016).

Hasta la fecha no existen terapias farmacológicas dirigidas a modular el citoesqueleto y la pérdida de las sinapsis en la EA (ver Tabla en Anexo N°1 que resume la Farmacología actualmente aprobada por la FDA para el manejo de la EA en humanos). Con esto en mente, **la presente Unidad de Investigación se centró en evaluar un posible mecanismo de regulación que involucre a las dinaminas como proteínas moduladoras del citoesqueleto y de la morfogénesis de espinas dendríticas** (Arriagada-Díaz, 2023).

1.5 Las dinaminas en el contexto de la EA.

Las dinaminas son una superfamilia de proteínas con actividad enzimática de tipo GTPasas, cuya principal función es el remodelamiento de membranas en diversos procesos celulares tales como endocitosis y exocitosis, pero también se destaca su rol regulador del citoesqueleto al interactuar con filamentos de actina y microtúbulos (Menon & Schafer, 2013; Arriagada-Diaz et al., 2020).

La superfamilia de las dinaminas se clasifica en dinaminas clásicas (dinamina-1, dinamina-2 y dinamina-3) y en proteínas tipo dinamina, dentro de las que destacan las DRPs, importantes mediadores de la fusión/fisión mitocondrial (Arriagada-Diaz et al., 2020). Las distintas isoformas de dinaminas poseen una estructura primaria común compuesta por cinco dominios estructurales: un dominio GTPasa catalítico amino terminal, un dominio medio necesario para su oligomerización, un dominio de homología a pleckstrina (PH) que le permite asociarse a lípidos de membrana, un dominio efector de la actividad GTPasa (GED) y un dominio rico en prolinas y argininas que le permite interactuar con distintos “socios” moleculares (González-Jamett et al., 2014; Arriagada-Diaz et al., 2020).

Hasta la fecha se ha descrito que las tres isoformas de dinamina clásicas, codificadas por tres genes distintos *DNM1* , *DNM2* y *DNM3*, respectivamente, se expresan ampliamente en los tejidos de mamíferos (Cao et al., 1998; Laiman et al., 2023). Particularmente en el sistema nervioso, a nivel sináptico, las dinaminas clásicas juegan papeles relevantes: las dinaminas 1, 2, y 3 (Dyn-1, Dyn-2, Dyn-3) participan en el reciclaje endocítico de las vesículas sinápticas a nivel presináptico; mientras que la Dyn-2 participa en la inserción y la Dyn-3 en la remoción de receptores postsinápticos, modulando de este modo la eficiencia en la neurotransmisión (González-Jamett et al., 2013; Arriagada-Diaz et al., 2020).

Recientemente se ha demostrado que polimorfismos en Dyn-2, que afectan la función de esta isoforma de dinamina y que causan un desorden neurológico periférico denominado miopatía centronuclear, también inducen alteraciones a nivel del sistema nervioso central. En este contexto, la pérdida de función de Dyn-2 afecta la morfología neuronal, disminuye la densidad de espinas dendríticas, perturba la transmisión sináptica excitatoria y disminuye la adquisición de memoria de reconocimiento en un modelo murino de la enfermedad (Arriagada-Diaz et al., 2023). Estos antecedentes sugieren que las dinaminas en general, y Dyn-2 en particular, juegan un rol clave en los mecanismos moleculares y celulares que determinan procesos cognitivos en el cerebro de los mamíferos.

Interesantemente, se ha demostrado que la exposición de neuronas hipocampales sometidas a dosis elevadas de oligómeros del péptido Aβ soluble conlleva a la activación de la proteasa Ca^{2+}

dependiente calpaína, la cual degrada a las dinaminas (Kelly et al., 2005). Además, se ha demostrado que en cerebros *postmortem* y en muestras de sangre de personas que padecían EA, los niveles de expresión de Dyn2 y su función se ven significativamente disminuidos en comparación a las demás isoformas (Aidaralieva et al., 2008; Kamagata et al., 2009). Por ende, **es factible suponer que defectos en la expresión y/o en la función de Dyn2 pueden contribuir a los mecanismos patológicos de la EA.** De ser así**,** es posible que al modular su expresión y/o actividad catalítica sea posible promover el remodelamiento del citoesqueleto neuronal favoreciendo la formación de espinas dendríticas, previniendo la pérdida de sinapsis y consecuentemente previniendo, o retardando el desarrollo de la EA.

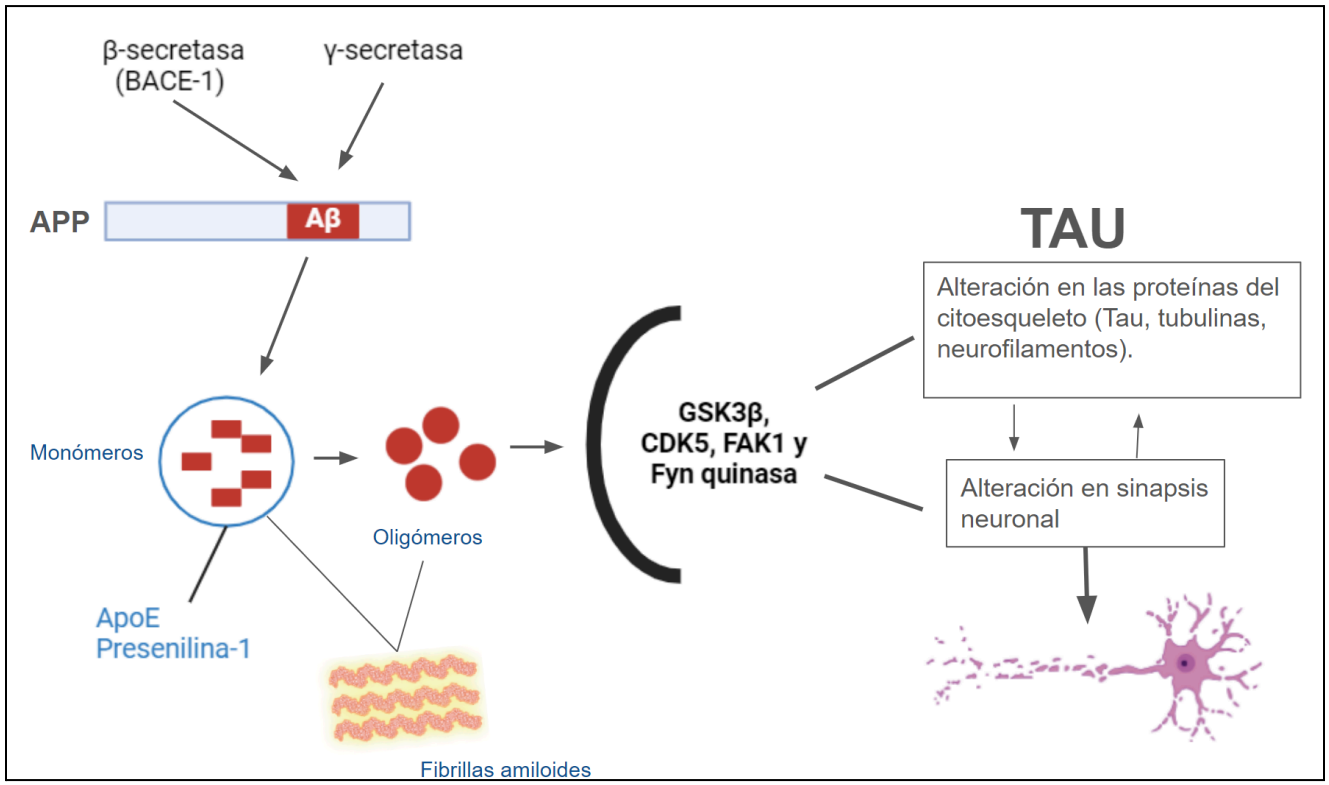


Figura N°1: *Diagrama esquemático que representa el procesamiento de APP, la formación de oligómeros Aβ y su interacción con Tau en los mecanismos de pérdida de sinapsis neuronales. A la izquierda, se muestra cómo la APP es escindida por β-secretasas (BACE-1) y γ-secretasas. Los monómeros formados pueden formar oligómeros Aβ que pueden ser eliminados por ApoE y Presenilina-1. Tanto los monómeros como los oligómeros progresan a la formación de fibrillas y placas amiloides, mientras que los oligómeros interactúan con receptores de superficie que a su vez activan diferentes quinasas que promueven la hiperfosforilación de la proteína Tau. Esto último conlleva a la desestabilización de microtúbulos, pérdida del transporte axonal y neurodegeneración. Figura elaborada con plataforma Biorender.*

1.6 BIST23 y su efecto sobre las dinaminas

Una alternativa farmacológica, capaz de potenciar la oligomerización y la actividad GTP-asa de las dinaminas es la droga BIST23 (Abcam, s.f.). Esta es una molécula sintética, comercializada como un activador de las dinaminas, que favorece su oligomerización, aumentando en varias veces su actividad GTP-asa basal (McCluskey et al., 2004). BIST23 es un análogo sintético de las tirfostinas, una amida asimétrica, cuya estructura se esquematiza en la Figura N°2.

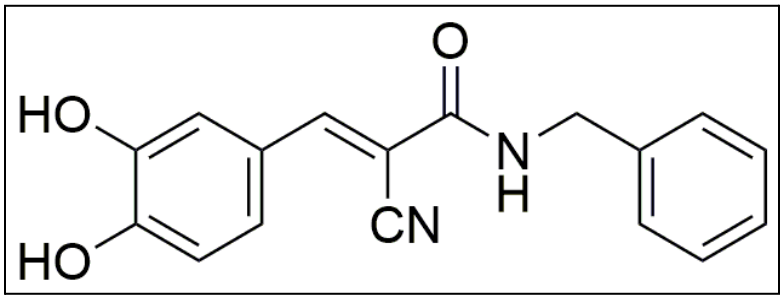


Figura N°2: Estructura química de BIST23. *Imagen adaptada de Chem-Impex International. (s.f.). 2-[(2,4-Dinitrophenyl)amino]ethyl 4-(phenylamino)butanoate. Recuperado el 18 de julio de 2025, de https://www.chemimpex.com/es/products/38306*

Si bien BIST23 no ha sido utilizada en contextos neurológicos, ha demostrado tener efectos positivos en otros contextos patológicos en los que se afecta la polimerización del citoesqueleto de actina (Schiffer et al., 2015).

Datos obtenidos preliminarmente en el Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular de la Universidad de Valparaíso (LAFINEM) muestran efectos positivos del BIST23 administrado vía intraperitoneal (IP) en ratones doble transgénico APP/PS1, modelo de EA (ver Anexo N°2). La cavidad peritoneal es un espacio cerrado dentro del abdomen que contiene los órganos abdominales, está revestida por la membrana serosa más extensa del cuerpo y está llena de una fina película de líquido compuesta de agua, electrolitos, proteínas, células y otras sustancias. Una de las principales desventajas de esta vía para la administración de intervenciones farmacológicas es que se usa mínimamente en la clínica (Wang et al., 2019) debido a que, para llegar al compartimento vascular después de la administración IP, un compuesto debe atravesar diferentes estructuras dentro y alrededor de la cavidad peritoneal, incluido el líquido peritoneal, el mesotelio, el submesotelio y la pared de los vasos sanguíneos para posteriormente pasar a circulación sistémica (Al Shoyaib et al., 2019).

Una ruta alternativa para la administración de fármacos hacia el sistema nervioso central es la intranasal (Figura N°3), esta constituye una forma más directa de administrar fármacos al cerebro, utilizando el epitelio olfatorio (Al Shoyaib et al., 2019). Este epitelio, situado en la parte superior de las fosas nasales, es el principal sitio de absorción de fármacos que van del tracto nasal al cerebro. Una vez que el fármaco atraviesa el epitelio olfatorio, se transporta a lo largo del nervio olfatorio hacia el cerebro (Trevino et al., 2020; Wang et al., 2019).

Los fármacos destinados al cerebro por la vía intranasal tienen numerosas ventajas además de superar las barreras biológicas (BHE, metabolismo de primer paso y degradación intestinal), rápida absorción del fármaco y biodisponibilidad mejorada (especialmente para fármacos lipofílicos) (Emad et al., 2021).

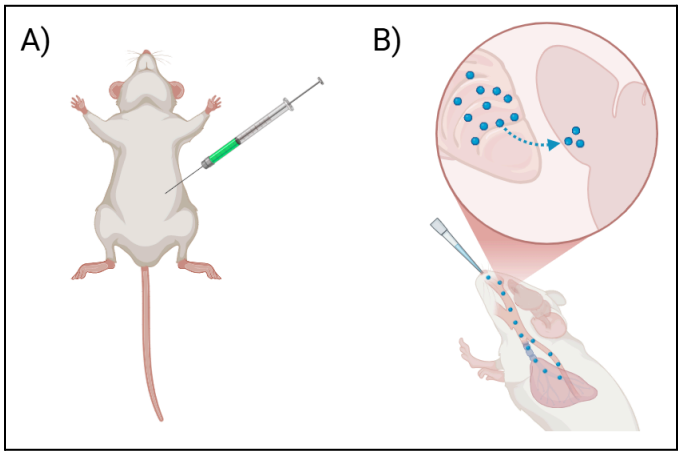


Figura N°3: Modelo representativo de las vías de administración de BIST23 a un modelo murino. (A) *Vía de administración intraperitoneal (IP).* ***(B)*** *Vía de administración intranasal. Figura elaborada con plataforma Biorender.*

En base a los antecedentes presentados, la presente unidad de investigación abordó la siguiente hipótesis experimental:

2. HIPÓTESIS

“La administración por vía intranasal de BIST23 previene la pérdida de espinas dendríticas y los defectos cognitivos en el contexto de la enfermedad de Alzheimer”.

Para abordar esta hipótesis se utilizó como modelo experimental de EA los ratones triple transgénico 3xTg. Estos ratones expresan tres mutaciones humanas que causan EA familiar en los genes PS1, APP y TAU (Oddo et al., 2003). Específicamente expresan las mutaciones M146V en el gen PS1, Swe en el gen APP y la mutación P301L en el gen TAU (Oddo et al., 2003).

Los ratones 3xTg desarrollan signos histopatológicos y fisiopatológicos de la EA de forma progresiva, incluida la formación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en la zona del hipocampo, amígdala y corteza cerebral. Además, a los 6 meses presentan una disminución significativa de plasticidad sináptica (Oddo et al., 2003).

Neuronas hipocampales cultivadas desde ratones 3xtg muestran además una pérdida significativa de la densidad y morfología sináptica (Oddo et al., 2003).

3. OBJETIVOS

Se plantearon los siguientes objetivos para el abordaje de la hipótesis:

3.1 Objetivo general: Evaluar el efecto de la administración intranasal de BIST23 en la densidad de espinas dendríticas y deterioro cognitivo en ratones 3xTg, modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

3.2 Objetivos específicos:

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Estimar el efecto de la administración intranasal de BIST23 en la memoria espacial y memoria de reconocimiento en ratones 3xTg, modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Estimar el efecto de la administración intranasal de BIST23 en la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales de tejido cerebral de ratones 3xTg, modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

Para abordar los dos objetivos específicos de esta Unidad de Investigación, se realizaron los siguientes procesos metodológicos:

4.1 Tipo de diseño

El diseño utilizado fue de tipo experimental, analítico y prospectivo.

- Experimental, ya que el investigador, ejerció el control de las variables con una metodología cuantitativa, en este caso con el uso de tratamiento farmacológico.
- Analítico, ya que buscó establecer relaciones de causa y efecto entre variables, es decir, determinar si una exposición causa un efecto en una variable de resultado.
- Prospectivo, ya que el inicio de la investigación fue anterior a los hechos estudiados y los datos se recogieron a medida que sucedieron.

4.2 Descripción de la población de estudio

En este estudio se utilizaron dos cepas de ratones: el ratón transgénico 3xTg, modelo murino de la EA y el ratón de camada silvestre (WT) de la cepa C57BL/6, machos de 6 meses, edad a la que la amiloidosis y taupatía ya están asentadas en los ratones 3xTg (Oddo et al., 2003).

Existió una estandarización de las condiciones macro y microambientales necesarias para lograr un manejo adecuado del entorno, alojamiento y cuidado de los animales de estudio. Lo anterior estuvo a cargo del personal técnico del Bioterio Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Esto permitió que los animales mantuvieran una buena salud, asegurando que su fisiología y comportamiento fueran normales y estables.

Todos los protocolos utilizados fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Valparaíso, en el marco del Proyecto Fondecyt Regular 1231511 de la Dra. Arlek Gonzalez-Jamett (ver Anexo N°3).

4.3 Muestreo y tamaño muestral

El tipo de muestreo utilizado fue intencionado, debido a que se seleccionó un grupo de animales determinado de cada cepa, con las características de interés para esta investigación.

El tamaño muestral (n=12), tres animales por cada una de las cuatro condiciones experimentales, se estimó considerando utilizar el menor número de animales necesarios para obtener resultados estadísticamente significativos. Por otro lado, se utilizaron los mismos animales para la realización de diferentes tipos de evaluación experimental.

4.4 Variables

- De exposición:
  - ➢ Presencia /ausencia de tratamiento con BIST23.
- De resultado:
  - ➢ Densidad de espinas dendríticas (N° de espinas/10 µm de eje dendrítico, Figura N°10).
  - ➢ Función cognitiva:
    - Distancia total recorrida (centímetros).
    - Índice de reconocimiento (segundos) y el índice de preferencia (%) de objetos nuevos en la prueba de reconocimiento de objetos nuevos (NOR).
    - Tiempo en el cuadrante de la plataforma y tiempo de latencia para llegar a la plataforma (segundos) en la prueba de Laberinto acuático de Morris (LAM).

4.5 Tratamiento farmacológico

Los ratones fueron tratados con una dosis fija de BIST23 diariamente durante 14 días mediante la vía intranasal. Los ratones fueron sedados con isofluorano inhalatorio (saturación), y sus cavidades nasales inundadas con 50 µL de una solución salina de BIST23 ajustando a una **dosis de 0,5 mg/Kg**. La dosis a considerar es en base a los resultados previos obtenidos en LAFINEM (ver Anexo N°2) en los que se asumió que el *delivery* IP de BIST23 requiere dosis más elevadas (10 mg/Kg) que el *delivery* intranasal, que es una vía de administración más directa al cerebro (Trevino et al., 2020; Wang et al., 2019; Emad et al., 2021).
Se administró solución salina pura como tratamiento vehículo (VEH) y control del efecto de BIST23.

4.6 Pruebas conductuales

Se realizaron evaluaciones del comportamiento para estimar la función cognitiva de los ratones 3xTg y WT. Se sometieron a tres test conductuales: la prueba del Laberinto Acuático de Morris para analizar memoria espacial, la prueba de Reconocimiento de Objetos Nuevos para medir la memoria de reconocimiento (Arriagada-Díaz et al., 2023) y la Prueba de campo abierto para medir la actividad locomotora y el comportamiento similar a la ansiedad (Kraeuter et al., 2019).

4.6.1 Prueba de Campo Abierto (OFT)

Es una medida común de la conducta exploratoria y la actividad general en roedores, donde se puede medir tanto la calidad como la cantidad de la actividad (Gould et al., 2009).
Este protocolo se llevó a cabo en un periodo de 3 días, los ratones fueron expuestos a una caja cuadrada de acrílico blanca, con dimensiones de 50 cm × 40 cm × 63 cm., para prevenir que los roedores puedan escapar (Seibenhener & Wooten, 2015).

Las variables de interés en el OFT fueron el tiempo de exploración, para analizar la actividad locomotora de los animales, el interés exploratorio, el bloqueo u otro comportamiento relacionado con el miedo, la enfermedad, el tiempo relativo en el ciclo circadiano, entre muchas otras variables. La distancia recorrida (centímetros), el tiempo dedicado al movimiento (segundos), el encabritamiento y el cambio en la actividad a lo largo del tiempo son algunas de las muchas medidas que se pueden tabular e informar (Gould et al., 2009).

Se utilizó una cámara de video y el software Any Maze para registrar a los sujetos de prueba y evaluar los resultados (Seibenhener & Wooten, 2015) (Figura N°4). Los ratones sanos normalmente se aclimatan al laberinto y eventualmente exploran el área central. Los animales más ansiosos pasan significativamente menos tiempo en el área abierta y más tiempo cerca de las paredes de la jaula del OFT (Carter y Shieh, 2015) (Figura N°4).

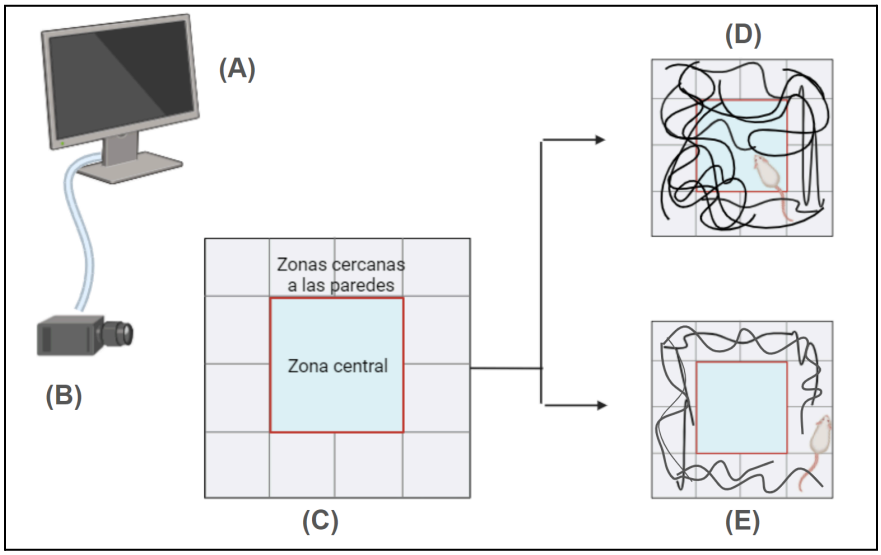


Figura N°4: Prueba de campo abierto. ***(A)*** *Computador para uso de software de seguimiento de video.* ***(B)*** *Cámara de video para captar los movimientos del sujeto de prueba.* ***(C)*** *Área donde se desenvolverá el roedor, se puede diferenciar la zona central y zonas cercanas a las paredes de la jaula.* ***(D)*** *Diagrama representativo del recorrido que realizaría un ratón sin ansiedad ni estrés.* ***(E)*** *Diagrama representativo del recorrido que realizaría un ratón ansioso y estresado. Figura elaborada con plataforma Biorender.*

4.6.2 Prueba de Reconocimiento de Objetos Nuevos (NOR)

La prueba NOR sirve para probar diferentes fases del aprendizaje y memoria de los ratones de manera rápida y eficiente (Lueptow, 2017).

Se llevó a cabo en tres sesiones, durante 3 días:

1) Se inició con la habituación del roedor, a la misma caja utilizada en el OFT, lo cual implica la exploración visual de dos objetos idénticos.
2) Se realizó el entrenamiento, donde se reemplazó uno de los objetos previamente evaluados por uno nuevo.
3) Se procedió a una sesión de prueba donde se espera que el roedor tenga preferencia por el nuevo objeto, ya que debería recordar el objeto familiar utilizado al inicio de la prueba.

En esta prueba se cuantificó la variable “índice de reconocimiento de objetos nuevos”, que se basa en el tiempo (segundos) que dedica el ratón a explorar el objeto novedoso dividido por el tiempo total de la prueba (segundos). Se esperaría que los valores estén entre 0 y 1 para un ratón que ejecuta la prueba según la conducta espontánea de un roedor (Lueptow, 2017; Antunes et al., 2012).

Existe evidencia de que tanto la memoria espacial como la memoria de reconocimiento, están disminuidas de manera significativa en los ratones 3xTg modelo de EA (Oddo et al., 2003; Stover et al., 2015).

4.6.3 Laberinto Acuático de Morris (LAM):

La prueba LAM tiene como objetivo estimar el aprendizaje y memoria espacial dependiente del hipocampo en roedores, incluyendo la adquisición de la memoria espacial a largo plazo (Othman et al., 2022).

En esta prueba los ratones fueron sumergidos en una piscina con agua temperada en la que existen pistas visuales dispuestas en las paredes de la piscina para que el animal encuentre la ubicación de una plataforma de escape que, durante el entrenamiento se localizó en un mismo cuadrante y posteriormente, durante los días de prueba, se fue modificando el cuadrante de entrada del ratón (Figura N°5).

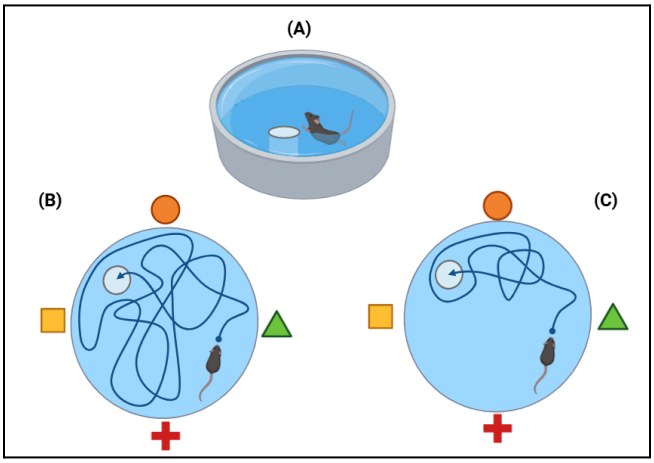


Figura N°5: Laberinto acuático de Morris. (A) *Piscina con agua temperada donde se sumergirá al ratón para encontrar la plataforma de escape.* ***(B)*** *Camino recorrido por el ratón el primer día que es sumergido hasta llegar a la plataforma.* ***(C)*** *Camino recorrido por el ratón el segundo día que es sumergido ya que debería estar familiarizado con las pistas visuales y demorar menos tiempo en encontrar la plataforma. Figura elaborada con plataforma Biorender.*

La principal ventaja del LAM es la diferenciación entre las condiciones espaciales dadas por una plataforma no visible, pero usando pistas visuales que estarán dispuestas en las paredes de la piscina donde se realizará la prueba. Estas pistas cuentan con diferentes formas como círculos, triángulos, cuadrados y cruces, y se ubican en locaciones fijas equidistantes distribuidas en los 4 cuadrantes de la piscina. Esta prueba se llevó a cabo en un periodo de 6 días (Tabla N° 1).

Tabla 1: *Protocolo usado en la prueba del laberinto acuático de Morris. Información basada en el trabajo "Prueba del laberinto acuático de Morris para detectar déficits de aprendizaje y memoria en ratones modelo con enfermedad de Alzheimer" de "Bromley-Brits et al., 2011.*

Día N°	Actividades realizadas
0	Se realizó la habituación inicial, todos los ratones fueron introducidos en la piscina mirando hacia la pared y desde la posición opuesta a donde se encontraba la plataforma. Durante este período los animales nadan libremente para que se familiaricen con la piscina, reconozcan los espacios y pistas visuales que se dispusieron en las paredes.
1	Se comenzó con el pre-entrenamiento, los animales se introdujeron en la piscina mirando hacia la pared, pero de manera aleatoria en diferentes cuadrantes, excepto en donde se encuentra la plataforma. En esta fase se introdujo la plataforma en el cuadrante predeterminado y se dejó levemente visible por sobre el agua. Durante este periodo los ratones deben nadar, encontrar la plataforma y subirse en ella para salir del agua. En caso de que los ratones no encuentren la plataforma se procederá a guiarlos hacia ella tomándolos desde la base de la cola.
2, 3, 4, 5	Se llevó a cabo el entrenamiento donde se introdujeron de manera aleatoria los ratones a alguno de los cuadrantes de la piscina mirando hacia la pared, excepto desde aquel que se encuentra la plataforma. En esta fase también estaba introducida la plataforma, pero esta vez

	no era visible, ya que estaba sumergida en el agua de modo que la única forma de encontrar la plataforma era recordando las pistas visuales.
6	Se retiró la plataforma y se efectuó la prueba definitiva, se introdujo el animal en la piscina mirando hacia la pared desde el cuadrante opuesto a donde se encontraba la plataforma, con el objetivo de evidenciar cuánto tiempo pasa el ratón en el cuadrante de la plataforma y cuánto tiempo se demora en llegar a ella.

En esta prueba se observaron dos variables a medir para la estimación de la memoria espacial: “tiempo de latencia para llegar a la plataforma” (segundos) y “tiempo en el cuadrante de la plataforma” (segundos) (Othman et al., 2022). En el primero se evalúa el entrenamiento, donde se mide el tiempo que demora en acceder a la plataforma oculta, por lo tanto, a medida que avanza el entrenamiento, se espera que el tiempo de latencia vaya disminuyendo lo que refleja el aprendizaje espacial funcional y la memoria en los ratones (Bromley-Brits et al., 2011). En el segundo se evalúa cuánto tiempo permanece el ratón en el cuadrante objetivo comparado con los demás cuadrantes una vez que se ha retirado la plataforma, y se ha evidenciado que si el tiempo en el cuadrante objetivo es mayor significa que hay una memoria espacial superior (Bromley-Brits et al., 2011).

4.7 Estudios histológicos

Una vez realizadas las pruebas de memoria y aprendizaje, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (en la fase de inducción 2-2,5% y durante la mantención 1-2%) para luego proceder a la perfusión con suero salino (0,9% de NaCl en agua destilada).
Los cerebros de ratones 3xTg y WT caracterizados conductualmente, fueron extraídos rápidamente y divididos en dos hemisferios. Uno de los hemisferios fue teñido con Tinción de Golgi para análisis de morfología neuronal y sináptica. El otro hemisferio cerebral fue criopreservado en un tanque de Nitrógeno líquido (-190 °C) para posteriores análisis bioquímicos, fuera del marco de esta Unidad de Investigación.

4.7.1 Técnica de Golgi-Cox.

La tinción de Golgi es un método histológico que revolucionó la neurociencia al revelar la citoarquitectura y la morfología detallada de una neurona, y ha sido el más usado para la observación y análisis de la morfología neuronal durante varias décadas (Garcilazo et al., 2024).

Este método se basa en una impregnación metálica de las neuronas para la observación del soma, los axones, las dendritas y las espinas dendríticas, mismas que permiten una obtención de datos acerca de las conexiones neuronales y los cambios en respuesta a múltiples influencias genéticas y ambientales, asociadas a alteraciones en la fisiología y el comportamiento de los organismos (Garcilazo et al., 2024). La impregnación de Golgi se aplica a bloques de tejido nervioso relativamente gruesos (0,5 a 1 cm aproximadamente) (Pombal, 2022).

Para la tinción y visualización de dendritas y espinas dendríticas, los cerebros fueron lavados con agua destilada para eliminar la sangre de la superficie. Luego, sumergidos en una solución de impregnación, mezclando volúmenes iguales de las soluciones A+B del kit comercial de Golgi (FD Rapid GolgiStain™, FD Neurotechnologies, Inc, PK401). En esta solución de impregnación, los hemisferios fueron almacenados a temperatura ambiente durante 2 semanas en oscuridad, posteriormente traspasados a la solución C del kit, y almacenados en oscuridad durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de inmersión, los cerebros se cortaron en secciones de 150 µm de grosor en un criostato a -25°C. A continuación, los cortes fueron traspasados a una solución D+E por 10

minutos, y después lavados dos veces con agua destilada durante 4 minutos. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados en etanol al 50%, 75%, 95% y 100% por 4 minutos, para finalmente ser lavados tres veces con xilol cada 4 minutos, y montados en portaobjetos para su posterior visualización y análisis.

4.7.2 Análisis morfométrico de espinas dendríticas

Las muestras teñidas con tinción de Golgi fueron visualizadas mediante microscopía de contraste de fase y fotografiadas utilizando un microscopio óptico Leica DM500 implementado con cámara digital Leica ICC50W. Las imágenes se analizaron utilizando el software Fiji.

Para cuantificar cambios en la densidad de espinas dendríticas de cada neurona analizada se tomaron al menos tres regiones de interés (ROIs) correspondientes a segmentos dendríticos apicales de 10 µm de largo. En cada uno de los ROIs se cuantificó la cantidad de espinas, reportándose la densidad de espinas dendríticas promedio en unidades de número de espinas/10 µm.

4.8 Análisis estadístico

Para hacer un análisis estadístico de los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas en el estudio se utilizó el software GRAPHPAD-10. Se utilizó el test de Shapiro-Wilks que plantea la hipótesis nula de que una muestra proviene de una distribución normal. Se considerará un nivel de significancia de 0.05, es decir que el nivel de confianza de los resultados deberá ser de al menos un 95%, considerando un p-value <0.05 como estadísticamente significativo al comparar distintas condiciones experimentales.

Si los test anteriores mostraban una distribución normal de los datos, se utilizó ANOVA una prueba estadística que compara las medias de tres o más grupos, ayudando a determinar si las diferencias observadas entre los grupos son significativas o se deben al azar. Para los datos que se distribuyeron de forma no paramétrica se utilizó el test de Kruskal Wallis para analizar las diferencias entre las distintas condiciones experimentales. Todos los datos se presentaron como promedios ± error estándar medio (SEM).

5. RESULTADOS

5.1 Efecto de la administración intranasal de BIST23 en la conducta de ratones 3xTg y WT

Con el objetivo de poder determinar la función cognitiva de los ratones WT y 3xTg, se realizó en los grupos animales una caracterización conductual. Se realizaron tres pruebas conductuales para evaluar la actividad locomotora por medio del test OF, el índice de preferencia por el objeto nuevo (ON) mediante el test de NOR y finalmente la memoria espacial de los ratones con el test LAM.

5.1.1 Test de OF

Durante un periodo de 3 días, los animales fueron sometidos a una prueba de exploración, con el fin de habituarse tanto a las condiciones de experimentación, como a la caja utilizada para realizar sus trayectorias en la prueba conductual.

Tal como se muestra en la Figura N°6 no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la distancia total recorrida. Todos los grupos presentaron valores similares, con cierto grado de variabilidad individual. Este control es fundamental para validar la interpretación de los datos conductuales como reflejo de procesos cognitivos específicos y no de confusores como hipoactividad, fatiga o falta de motivación.

El grupo WT VEH mostró una distancia recorrida promedio de aproximadamente 20+/- 0,2 cm, con una variabilidad moderada entre los individuos. No se observan valores extremos.

Las pruebas estadísticas indican que no hubo diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$).

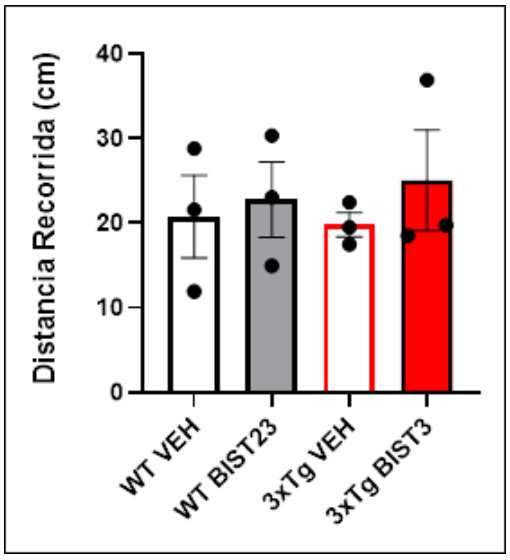


Figura N°6: Distancia total recorrida (en cm) por los distintos grupos experimentales durante la prueba conductual [OFT]*. Se comparó el grupo control (WT VEH), el grupo tratado con BIST23 (WT BIST23), el grupo transgénico sin tratamiento (3xTg VEH) y el grupo transgénico tratado con BIST3 (3xTg BIST3). Los valores se expresan como media ± error estándar de la media (SEM). Cada punto individual representa un animal (n = 3 por grupo).*
El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal–Wallis (p = 0.9098), ya que no se asumió una distribución normal de los datos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

5.1.2 Test de NOR

A continuación, durante 2 días consecutivos los animales fueron sometidos al test de NOR, donde debían explorar objetos familiares y nuevos. Se observó que todos los grupos, tanto WT como 3xTg, tratados con VEH o BIST23, exploraron de forma similar ambos objetos, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura N°7A). La alta dispersión de los datos sugiere variabilidad individual alta, lo que puede dificultar la interpretación clara de una preferencia.

Los datos también muestran una disminución en el índice de preferencia ON en el grupo 3xTg VEH en comparación con el grupo 3xTg BIST23 (Figura N°7B), lo que sugiere un déficit en la memoria de reconocimiento en los animales transgénicos. El tratamiento con BIST23 en el grupo 3xTg tendió a aumentar el índice de preferencia por el ON a niveles comparables a los del grupo control (WT VEH), aunque sin significancia estadística.

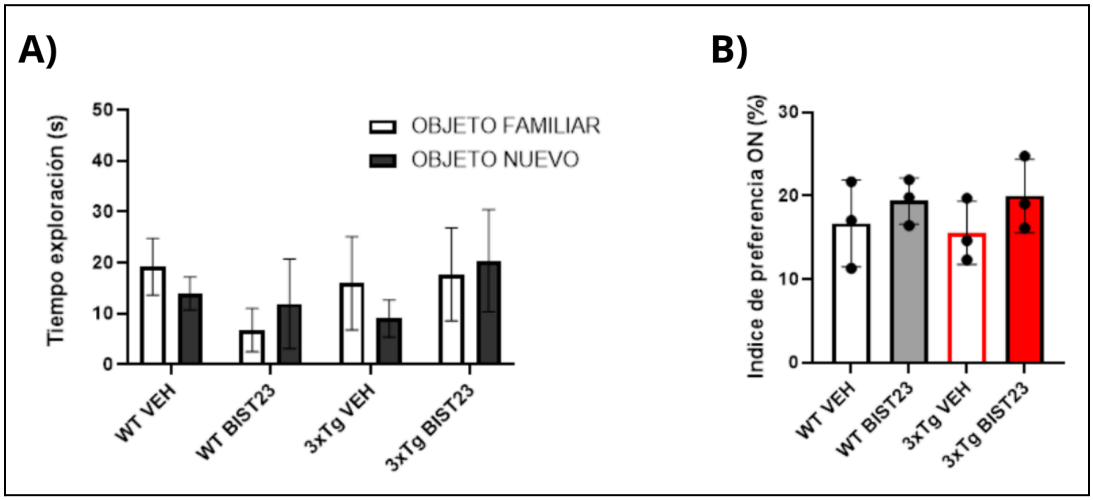


Figura N°7: Efecto del tratamiento con BIST23 sobre la memoria de reconocimiento de objetos (test de NOR) en ratones WT y 3xTg. (A) *Tiempo de exploración (en segundos) del objeto familiar (barras blancas) y del objeto nuevo (barras negras) durante el test de NOR. No se observaron diferencias significativas en el tiempo de exploración entre los objetos en ninguno de los grupos experimentales.* ***(B)*** *Índice de preferencia por el objeto nuevo (ON), expresado como porcentaje. El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales (p = 0.5460). Los datos se presentan como media ± SEM (n = 3 por grupo).*

5.1.3 Prueba de LAM

Por último, los animales fueron evaluados para la memoria espacial en el Laberinto Acuático de Morris (LAM, Figura N°5), donde se midió el tiempo de latencia para acceder a la plataforma como indicativo de aprendizaje espacial y el tiempo que los ratones permanecieron en el cuadrante objetivo cuando la plataforma se ocultó, como indicativo de memoria espacial a largo plazo.

En relación al tiempo de latencia para llegar a la plataforma, todos los grupos mostraron una tendencia a disminuir su latencia a lo largo de los días, lo que indica aprendizaje espacial (Figura N°8A). Sin embargo, se observó una gran variabilidad individual. El grupo 3xTg VEH mostró mayores latencias, mientras que el grupo 3xTg BIST23 mostró una latencia menor, especialmente en los días 2 y 3, aunque sin significancia estadística. Los grupos WT con y sin tratamiento mostraron curvas similares.

Respecto al tiempo en el cuadrante objetivo, numéricamente los grupos WT tendieron a pasar más tiempo en el cuadrante objetivo (Figura N°8B), sin embargo, y posiblemente debido a la alta variabilidad, no se observaron diferencias significativas entre los grupos según el análisis de Kruskal-Wallis (p = 0.6694).

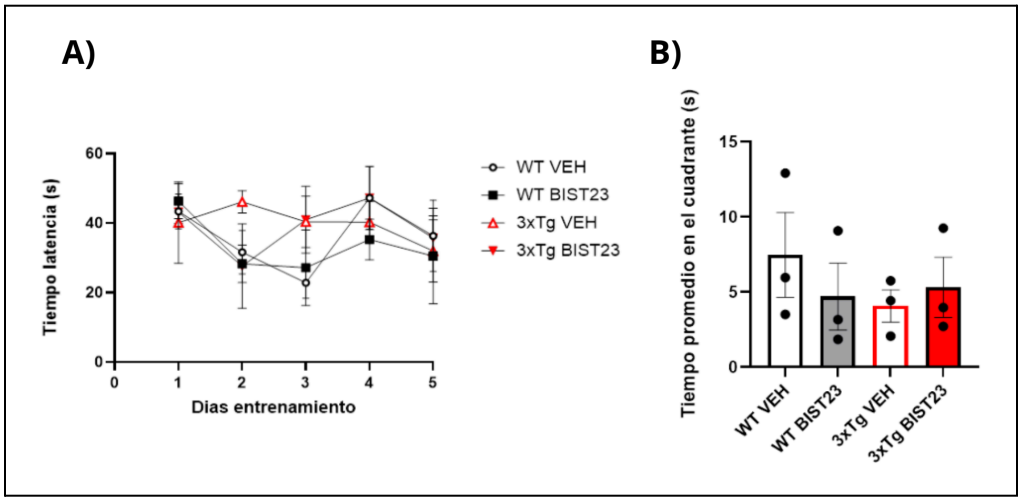


Figura N°8: Evaluación del aprendizaje espacial y memoria en la prueba del Laberinto Acuático de Morris (LAM).
(A) *Latencia para encontrar la plataforma sumergida durante las sesiones de entrenamiento (días 1 a 5). No se evidencian diferencias significativas entre los grupos experimentales (n = 3). Los datos se presentan como media ± SEM.*
(B) *Tiempo promedio que los animales pasaron en el cuadrante objetivo durante la prueba de memoria a largo plazo (el día de la prueba, en segundos). No se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, según el análisis estadístico Kruskal-Wallis (p = 0.6694).*

5.2 Efecto de la administración intranasal de BIST23 sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas 3xTg y WT

Finalizadas las pruebas conductuales, los animales fueron eutanasiados para poder realizar el análisis histológico. El cerebro de los animales fue dividido para poder realizar distintos tipos de estudios, uno de los hemisferios (izquierdo) se usó para la tinción de Golgi y el otro fue almacenado en condiciones de criopreservación para futuros estudios bioquímicos.

5.2.1 Morfología neuronal en el hipocampo

Con el fin de observar la morfología neuronal general se realizó la tinción de Golgi, la Figura N°9 muestra microfotografías representativas de la morfología neuronal hipocampal en animales WT y 3xTg, tratados o no con el compuesto BIST23.

En los paneles A (WT-VEH) y B (WT-BIST23) se observa una morfología dendrítica densa y ramificada. No se apreciaron alteraciones evidentes entre ambos grupos. Por otro lado, en el panel C (3xTg-VEH) se evidencia una clara alteración morfológica: las dendritas presentan una menor complejidad en cuanto a su ramificación, comparado con los grupos WT. Estas características reflejan un deterioro estructural característico del modelo 3xTg, asociado a pérdida sináptica y deterioro cognitivo.

En el panel D (3xTg-BIST23) se aprecia una mayor complejidad del árbol dendrítico respecto al grupo 3xTg VEH. Las neuronas presentan un patrón de ramificación más robusto, aunque aún no alcanzan el nivel observado en los grupos WT.

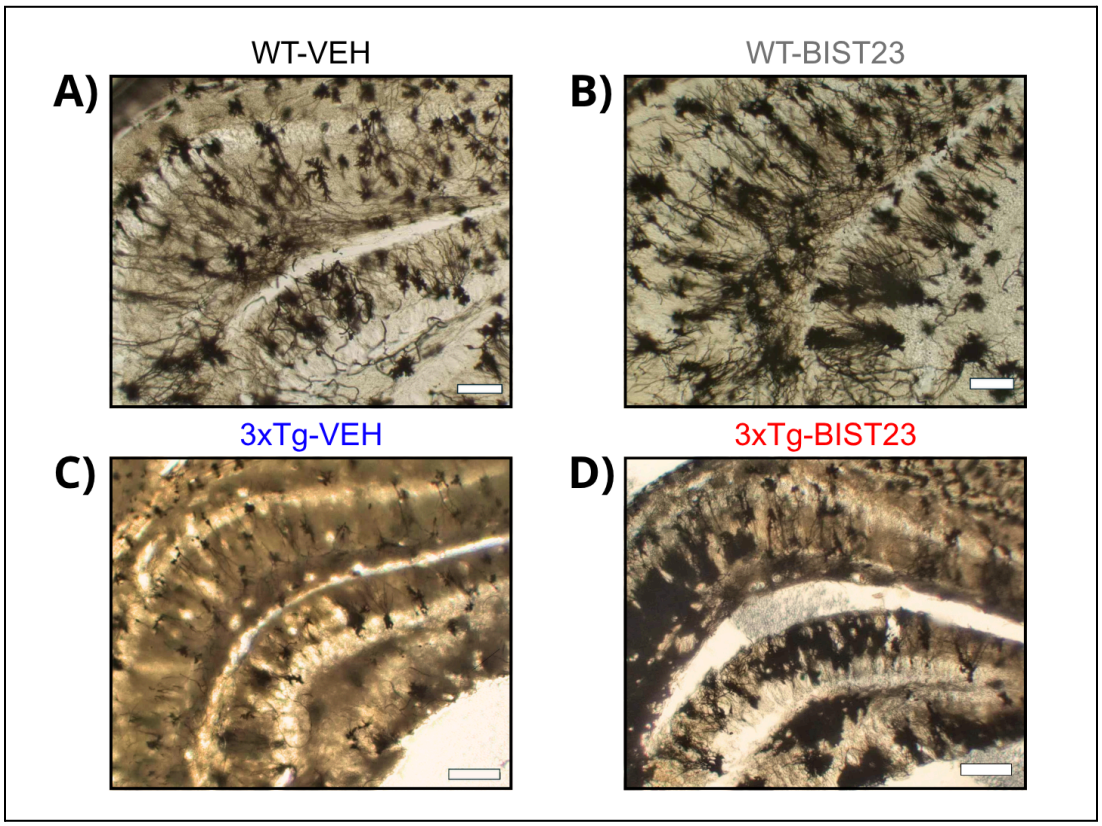


Figura N°9: Morfología general del hipocampo en animales WT y 3xTg con y sin tratamiento con BIST23. *Microfotografías representativas de la tinción de Golgi de hipocampo de los ratones WT-VEH* ***(A)****, WT-BIST23* ***(B)****, 3xTg-VEH* ***(C)*** *y 3xTg-BIST23* ***(D)****. La barra de escala representa 100 µm.*

5.2.2 Densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales teñidas con Golgi-Cox

Para observar los efectos del tratamiento sobre la neurodegeneración se utilizó la técnica de tinción de Golgi. En el hipocampo, se seleccionaron campos de 100 x 200 µm, donde se seleccionaron 3 neuronas por cada animal, por cada condición (n = 12, 36 neuronas). Posteriormente se cuantificaron espinas dendríticas en al menos tres regiones de interés (ROIs) por cada neurona (108 ROIs) correspondientes a segmentos dendríticos apicales de 10 µm (Figura N°10).

En la Figura N°10, los paneles A (WT-VEH) y B (WT-BIST23) muestran una alta densidad de espinas distribuidas a lo largo de las dendritas, con una morfología normal, bien ramificada. Las flechas blancas destacan las espinas, que aparecen en número abundante y regularmente distribuidas.

En contraste, en el panel C (3xTg-VEH) se evidencia una reducción significativa en la cantidad de espinas dendríticas. Las dendritas se visualizan más delgadas, menos ramificadas y con menor densidad de espinas. En el panel D (3xTg-BIST23) se observa un aumento en la densidad de espinas en comparación con el grupo 3xTg VEH.

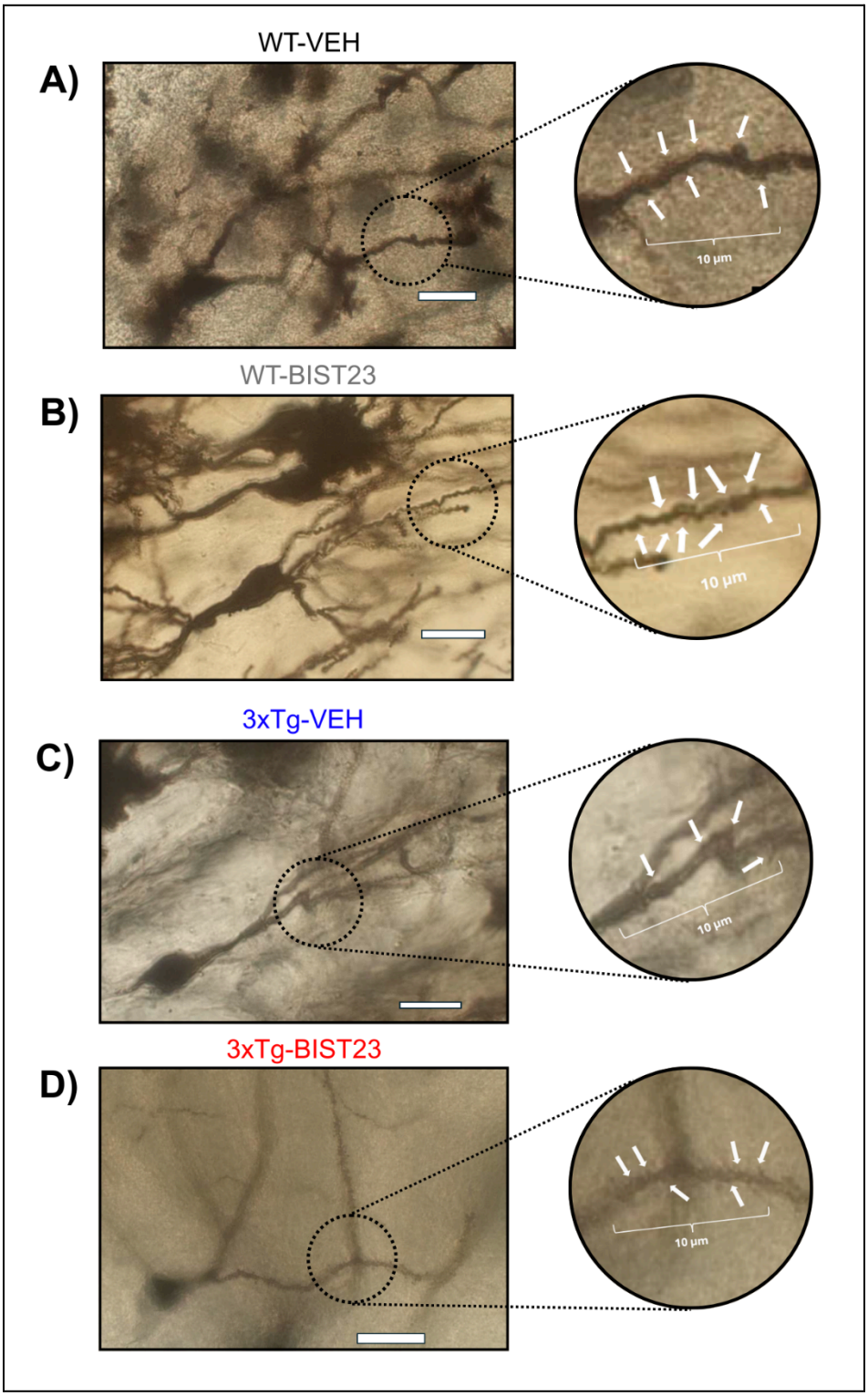


Figura N°10: Evaluación de la morfología dendrítica en neuronas del hipocampo de ratones WT y 3xTg con y sin tratamiento con BIST23. *Microfotografías representativas de neuronas teñidas con Golgi-Cox muestran dendritas de células piramidales de los ratones WT-VEH* ***(A)****, WT-BIST23* ***(B)****, 3xTg-VEH* ***(C)*** *y 3xTg-BIST23* ***(D)****. Las flechas blancas indican la presencia de espinas dendríticas. La barra de escala representa 10 µm.*

Posterior a la cuantificación visual de espinas dendríticas, estos datos numéricos fueron llevados a análisis estadístico.

Los datos mostraron una reducción significativa en la densidad de espinas en el grupo 3xTg VEH en comparación con todos los demás grupos experimentales, lo cual es consistente con el fenotipo neurodegenerativo característico del modelo 3xTg (Figura N°11).

El tratamiento con BIST23 en los ratones 3xTg previno esta diferencia, mostrando este grupo un aumento significativo en la densidad es espinas respecto al grupo 3xTg VEH (p = <0.0001). Además, el grupo WT VEH mostró una densidad significativamente mayor que el grupo 3xTg BIST23 (p = 0.0125) (Figura N°11).

No se observaron diferencias significativas entre WT VEH y WT BIST23, ni entre WT BIST23 y 3xTg BIST23 (Figura N°11).

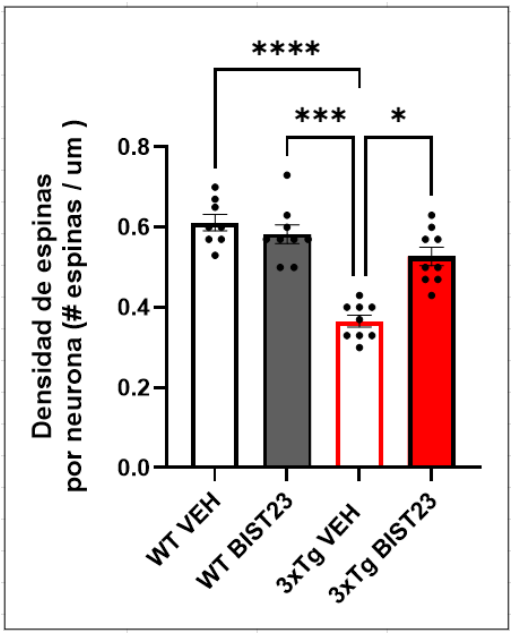


Figura N°11: Efecto del tratamiento con BIST23 sobre la densidad de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo. *La densidad de espinas (número de espinas/µm) fue cuantificada en neuronas hipocampales de ratones WT y 3xTg tratados con vehículo (VEH) o BIST23. El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido del test post hoc de comparaciones múltiples de Dunn reveló diferencias significativas entre los grupos (p < 0.0001). En particular, se observó una reducción significativa en la densidad de espinas en el grupo 3xTg VEH en comparación con los grupos WT VEH (p < 0.0001), WT BIST23 (p < 0.0001) y 3xTg BIST23 (p < 0.0001). Además, el grupo WT VEH presentó una densidad significativamente mayor que el grupo 3xTg BIST23 (p = 0.0125). No se encontraron diferencias significativas entre WT VEH y WT BIST23, ni entre WT BIST23 y 3xTg BIST23 (p > 0.9999 y p = 0.3899, respectivamente) (n = 9, se comparan 9 neuronas por cada grupo experimental).*

Posteriormente se realizó el análisis considerando el promedio de densidad de espinas por animal (WT VEH, WT BIST23 y 3xTg BIST23), donde se observó que el grupo 3xTg VEH presentó una disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas en comparación con el grupo WT VEH (p = 0.0367), lo que confirma la existencia de una pérdida sináptica generalizada en el modelo transgénico 3xTg (Figura N°12).

Aunque el grupo 3xTg BIST23 mostró un leve aumento en la densidad de espinas respecto al grupo 3xTg VEH, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, posiblemente debido al tamaño muestral limitado (n=3 por grupo) y a la variabilidad interindividual (Figura N°12).

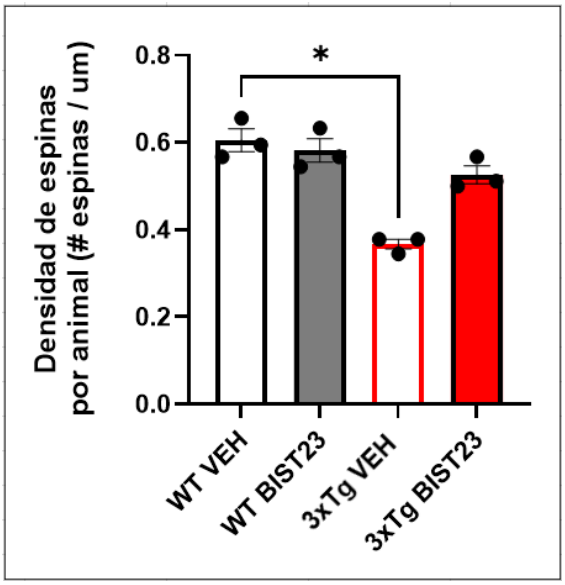


Figura N°12: Efecto del tratamiento con BIST23 sobre la densidad de espinas dendríticas por animal. *Se cuantificó la densidad de espinas dendríticas (número de espinas/µm) en neuronas hipocampales de ratones WT y 3xTg tratados con vehículo (VEH) o con BIST23. El análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn, reveló una* ***disminución significativa en la densidad de espinas en el grupo 3xTg VEH en comparación con el grupo WT VEH*** *(p = 0.0367). No se observaron diferencias significativas entre los otros grupos. Los datos se representan como media ± SEM (n = 3, se comparan 3 animales por cada condición).*

6. DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia neurodegenerativa, y se caracteriza por un deterioro progresivo de la memoria, la pérdida de sinapsis y la acumulación de placas de β-amiloide y ovillos neurofibrilares de proteína tau (Querfurth & LaFerla, 2010; Selkoe & Hardy, 2016). Actualmente, no existe una cura para la EA, y los tratamientos disponibles ofrecen únicamente beneficios sintomáticos limitados (Cummings et al., 2019). Esto ha impulsado la investigación hacia nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a los mecanismos tempranos del deterioro sináptico, que preceden a la muerte neuronal y al déficit cognitivo evidente (DeKosky & Scheff, 1990; Forner et al., 2017).

En este contexto, la presente unidad de investigación evaluó el efecto del compuesto BIST23 sobre parámetros morfológicos y conductuales en el modelo transgénico 3xTg, ampliamente utilizado por recapitular tanto la patología amiloide como la taupatía y los déficits cognitivos progresivos característicos de la EA (Stover et al., 2015).

6.1 Memoria y capacidad cognitiva

Para determinar la función cognitiva de los ratones WT y 3xTg, antes y después del tratamiento con BIST23, se realizó una primera aproximación en la búsqueda de correlatos entre neurodegeneración tipo EA y alteraciones cognitivas, ya que, un componente cognitivo afectado tempranamente en la EA es la pérdida de la capacidad de reconocimiento de personas y objetos (Yesavage et al., 1993). Es

por ello que se efectuó una caracterización conductual evaluando la capacidad cognitiva en el modelo de EA, utilizando tareas dependientes de estructuras cerebrales como el hipocampo, afectadas tempranamente en la EA (Scheff & Price, 2003; Buckner, 2004).

En relación al test de OF, es importante destacar que no se observaron diferencias en la distancia total recorrida entre los grupos, descartando alteraciones locomotoras como variable de confusión, lo cual coincide con la literatura (Kraeuter et al., 2019). Esto confirma que los efectos observados en los ensayos cognitivos no pueden atribuirse a diferencias en la actividad motora o niveles de motivación, permitiendo fortalecer la validez de los resultados conductuales. Asimismo, el tratamiento con BIST23 no influyó en la locomoción en ratones WT ni en 3xTg, lo cual refuerza su perfil de seguridad.

En la prueba del LAM el grupo 3xTg VEH mostró un rendimiento deteriorado en el aprendizaje espacial, evidenciado por mayores latencias para encontrar la plataforma durante el entrenamiento, mientras que los ratones 3xTg tratados con BIST23 evidenciaron una leve mejora en su desempeño, aunque sin alcanzar diferencias significativas en la prueba de memoria a largo plazo (tiempo en el cuadrante objetivo). Esta tendencia se complementa con los resultados de la prueba de NOR, donde el grupo 3xTg VEH exhibió un menor índice de preferencia por el ON en comparación con los grupos WT, sugiriendo un posible déficit en la memoria de reconocimiento.

Si bien el análisis del test de LAM no mostró diferencias significativas en la prueba de memoria a largo plazo, se observó una tendencia a una menor latencia durante los días de entrenamiento en el grupo 3xTg BIST23 en comparación con 3xTg VEH, lo cual sugiere una posible mejora en la capacidad de aprendizaje espacial. Por otro lado, en la prueba de NOR el índice de preferencia por el ON fue levemente mayor en los animales 3xTg BIST23 que en 3xTg VEH, lo que podría reflejar una recuperación parcial de la memoria de reconocimiento, aunque sin alcanzar significancia estadística.

Los resultados obtenidos del grupo de animales 3xTg VEH coinciden con la literatura, de que tanto la memoria espacial como la memoria de reconocimiento, están disminuidas de manera significativa en los ratones 3xTg modelo de EA (Oddo et al., 2003).

En relación a los resultados del tiempo en el cuadrante, se sugiere que el tratamiento con BIST23 no produjo una mejora significativa en la memoria espacial a largo plazo en los ratones 3xTg bajo estas condiciones experimentales. Respecto al tiempo de latencia para llegar a la plataforma los grupos WT (con y sin tratamiento) mostraron curvas similares, lo que indica que BIST23 no afecta negativamente el rendimiento cognitivo en animales sanos.

De acuerdo con lo observado luego de la evaluación conductual, el tratamiento con BIST23 no generó cambios significativos en los grupos experimentales tanto en actividad locomotora como memoria espacial.

6.2 Efecto de BIST23 sobre la densidad de espinas dendríticas

El aspecto más temprano de la EA, que se correlaciona con el inicio del déficit cognitivo, es la pérdida de sinapsis funcionales (Selkoe, 2002), particularmente debido a la pérdida de espinas dendríticas que son los principales sitios de contacto sináptico en el cerebro mamífero (Peters et al., 2008).

Considerando que las dinaminas parecen tener un rol clave en la morfogénesis de neuritas y espinas dendríticas en neuronas hipocampales (Arriagada-Díaz et al., 2023), se evaluó si la administración de BIST23 tuvo un impacto a este nivel.

Es por ello que se decidió realizar una cuantificación de espinas dendríticas en neuronas del hipocampo, estructura fuertemente relacionada con procesos de aprendizaje y memoria (Squire & Zola, 1996; Squire et al., 2007).

Por otra parte, la actina y los microtúbulos son los principales componentes estructurales que subyacen la morfología dendrítica (Wicki-Stordeur et al., 2013; Sanchez-Arias et al., 2019). Por lo tanto, BIST23 podría estar regulando el remodelamiento de actina y microtúbulos, a través de modular positivamente la actividad de las dinaminas, y en consecuencia desencadenar cambios en la morfogénesis de las dendritas.

A nivel morfológico, tras realizar la tinción de Golgi, el análisis de la densidad de espinas dendríticas en neuronas hipocampales mostró resultados más concluyentes: los animales 3xTg VEH presentaron una disminución significativa en la densidad de espinas en comparación con los grupos WT.

Se observó una reducción significativa en la densidad de espinas en el grupo 3xTg VEH en comparación con todos los demás grupos (WT VEH, WT BIST23 y 3xTg BIST23), lo cual es consistente con el fenotipo neurodegenerativo característico del modelo 3xTg (Oddo et al., 2003). Esta pérdida estructural refleja probablemente una disfunción sináptica subyacente, que podría contribuir a los déficits cognitivos observados por otros estudios previos y que no fueron reproducibles en esta investigación (Terry et al., 1991; Forner et al., 2017).

Aunque el grupo 3xTg BIST23 mostró un leve aumento en la densidad de espinas respecto al grupo 3xTg VEH, esta diferencia no fue estadísticamente significativa al analizar los resultados promediados por animal, sin embargo, esta tendencia, junto con la ausencia de diferencias entre WT VEH y WT BIST23, sugiere que el tratamiento con BIST23 no induce efectos adversos sobre la arquitectura sináptica en animales sanos, y podría tener un efecto restaurador parcial en condiciones patológicas.

El grupo 3xTg VEH presentó una disminución significativa en la densidad de espinas dendríticas por animal en comparación con el grupo WT VEH, lo que confirma la existencia de una pérdida sináptica generalizada en el modelo transgénico 3xTg. Este hallazgo es consistente con la literatura que describe el deterioro progresivo de la conectividad sináptica como una de las primeras alteraciones estructurales en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (DeKosky & Scheff, 1990; Terry et al., 1991; Scheff & Price, 2003). La pérdida de sinapsis se ha correlacionado estrechamente con el deterioro cognitivo en la EA, incluso más que la acumulación de placas amiloides, posicionándose como un marcador temprano y crítico de la enfermedad (Terry et al., 1991; Forner et al., 2017).

Estos resultados refuerzan la evidencia de que el modelo 3xTg presenta una pérdida significativa de espinas dendríticas, incluso al ser analizada a nivel de animal, y que el tratamiento con BIST23 podría tener un potencial efecto neuroprotector. Esta tendencia, es coherente con los datos obtenidos a nivel celular (por neurona) y con las observaciones morfológicas cualitativas (tinciones de Golgi), así como con los resultados conductuales que sugieren una mejora parcial de la función cognitiva en los animales tratados.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que BIST23 contribuye a mitigar el deterioro estructural inducido por la patología neurodegenerativa, favoreciendo la plasticidad sináptica y, potencialmente, la función cognitiva.

Se esperaba que el tratamiento con BIST23 mejorara la memoria espacial y de reconocimiento, de manera significativa en los ratones 3xTg considerando que se ha descrito una disminución de la expresión y de la actividad de las dinaminas en el contexto de la EA (Aidaralieva 2008; Kamagata 2009). Ahora bien, un aspecto importante que no se abordó en esta unidad de investigación fue evaluar si el tratamiento con BIST23 modificó la expresión de las dinaminas en estos animales. Hasta la fecha no existe claridad sobre el mecanismo a través del cual las tirfostinas como BIST23 modulan de manera positiva la actividad catalítica de las dinaminas, cual es el sitio de unión, o su mecanismo de acción (Hilll et al., 2005). Datos no publicados del Laboratorio LAFINEM, en base a estudios *in silicos* de dinámica molecular, sugieren que BIST23 se une al dominio PH de Dyn2. Esto prevendría la autoinhibición que ejerce el dominio PH sobre la actividad GTPasa de las dinaminas (Hill et al., 2005) y consecuentemente potenciaría su oligomerización y actividad catalítica. En tales condiciones, Dyn2 más activa podría modular positivamente el remodelamiento del citoesqueleto neuronal favoreciendo la espinogénesis y neuritogénesis que se afecta en el contexto de la EA, lo que sería congruente con los resultados obtenidos a lo largo de esta Unidad de Investigación.

6.3 Administración de BIST23 intranasal v.s intraperitoneal

Como se mencionó anteriormente, este estudio se basó en resultados obtenidos preliminarmente en el Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular de la Universidad de Valparaíso (LAFINEM), donde se muestran efectos positivos del BIST23 administrado vía intraperitoneal (IP) en ratones doble transgénico APP/PS1, modelo murino de la EA (ver Anexo N°2).

A diferencia del estudio anteriormente mencionado, en esta unidad de investigación la droga comercial BIST23 fue administrada por la ruta intranasal (Figura N°3) , buscando una forma más directa de administrar fármacos al cerebro (Al Shoyaib et al., 2019).

Al comparar los datos obtenidos en ambos estudios; aunque en distintos modelos murinos; específicamente los de la prueba de NOR, se obtuvo que el efecto de BIST23 sobre la memoria de reconocimiento podría ser modelo-dependiente.

En el modelo APP/PS1, el compuesto logra revertir significativamente el déficit cognitivo en la tarea NOR, mientras que en el modelo 3xTg, el efecto es más leve y no significativo. Esto podría deberse a diferencias en las características patológicas de cada modelo (por ejemplo, aparición de tauopatía en 3xTg), a la progresión de la enfermedad al momento del tratamiento, o a diferencias en el diseño experimental (tiempo de administración, dosis, edad de los animales, etc.).

En conjunto, estos datos sugieren que BIST23 tiene potencial para mejorar la memoria de reconocimiento en modelos de Alzheimer, aunque su eficacia podría variar según el contexto patológico. Se sugiere seguir investigando su efecto en distintos estadios de la enfermedad y en combinación con otros modelos y enfoques.

Para este estudio seleccionamos animales WT de 6 meses de edad que debieron ser trasladados desde un bioterio a otro, esto podría explicar la variabilidad conductual entre los animales. Por otra parte, los animales 3xTg presentaron un comportamiento más sistemático, lo cual podría deberse a que siempre se mantuvieron en condiciones macro y microambientales constantes (mismo bioterio a lo largo de su vida).

Otro factor importante a considerar es la cantidad de animales usados en el estudio, puesto que la baja cantidad de animales fue dificultosa para obtener resultados estadísticamente significativos.

Finalmente, es necesario realizar un futuro estudio, utilizando un mayor número de animales, con el fin de observar si el tratamiento con BIST23 por la vía intranasal podría tener un rol preventivo en el daño cognitivo y sináptico producido en la EA.

7. CONCLUSIONES

1- El tratamiento con BIST23 rescata de forma significativa la densidad de espinas dendríticas de ratones 3xTg, lo que sugiere su potencial terapéutico en la preservación de la integridad sináptica y funcionalidad neuronal en la enfermedad de Alzheimer.

2- Los resultados del Test de NOR no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo, el grupo 3xTg VEH presentó una ligera disminución en el índice de preferencia por ON, lo que podría indicar un deterioro en la memoria de reconocimiento asociado al modelo 3xTg. La administración de BIST23 tiende a prevenir parcialmente esta alteración, aunque los efectos observados no son significativos.

3- Aunque no se observaron diferencias significativas en la memoria a largo plazo, los resultados del entrenamiento sugieren que BIST23 podrían mejorar parcialmente el aprendizaje espacial en el modelo 3xTg. Aunque son efectos sin significancia estadística, estos son consistentes con la posible acción neuroprotectora de BIST23 observada en la densidad de espinas dendríticas.

4- Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que BIST23 tiene un efecto positivo sobre la integridad sináptica en un contexto de neurodegeneración, probablemente al promover la formación o estabilización de espinas dendríticas. Este efecto estructural podría estar vinculado a las tendencias de mejora cognitiva observadas en las pruebas de comportamiento, como el Morris Water Maze o el reconocimiento de objetos. En conjunto, los resultados posicionan a BIST23 como un potencial candidato terapéutico para prevenir el deterioro sináptico asociado a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

8. REFERENCIAS

- Abcam. (n.d.). Ryngo® 1-23, Dynamin activator (CAS 171674-76-3) (ab146050). Abcam. Retrieved July 14, 2023, from https://www.abcam.com/products/biochemicals/ryngo-1-23-dynamin-activator-ab146050.html
- Aidaralieva, N. J., Kamino, K., Kimura, R., Yamamoto, M., Morihara, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Kida, T., Okuda, J. I., Uema, T., Yamagata, H., Miki, T., Akatsu, H., Kosaka, K., & Takeda, M. (2008). Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in non-APOE-epsilon4 carriers. Journal of human genetics, 53(4), 296–302. https://doi.org/10.1007/s10038-008-0251-9
- Al Shoyaib, A., Archie, S. R., & Karamyan, V. T. (2019). Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?. Pharmaceutical research, 37(1), 12. https://doi.org/10.1007/s11095-019-2745-x
- Alarcón-Aguilar, A., Maycotte-González, P., Cortés-Hernández, P., López-Diazguerrero, N. E., & Königsberg, M. (2019). Dinámica mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. Gaceta medica de Mexico, 155(3), 276–283. https://doi.org/10.24875/GMM.18004337
- Albert Cabrera, M. J., Martínez Pérez, R., Gutiérrez Ravelo, A., Hakim Rodríguez, D., & Pérez Davison, G. (2014). Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Farmacia, 48*(3), 508–518. Recuperado el 28 de febrero de 2025, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300016&lng=es&tlng=es
- Alzheimer's Association. (s. f.). *Aducanumab está aprobado como el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer*. Alzheimer's Disease and Dementia. Recuperado el 23 de agosto de 2025, de https://www.alz.org/alzheimer-demencia/tratamientos/aducanumab-noticias
- Alzheimer's Association. (2024). Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 20*(5), 3708–3821. https://doi.org/10.1002/alz.13809
- Antunes, M., & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive processing, 13(2), 93–110. https://doi.org/10.1007/s10339-011-0430-z
- Arriagada-Diaz, J., Flores-Muñoz, C., Gómez-Soto, B., Labraña-Allende, M., Mattar-Araos, M., Prado-Vega, L., Hinostroza, F., Gajardo, I., Guerra-Fernández, M. J., Bevilacqua, J. A., Cárdenas, A. M., Bitoun, M., Ardiles, A. O., & Gonzalez-Jamett, A. M. (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), e12918. https://doi.org/10.1111/nan.12918
- Arriagada-Diaz, J., Prado-Vega, L., Cárdenas, A. M., Ardiles, A. O., & Gonzalez-Jamett, A. M. (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
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. The Journal of clinical investigation, 115(6), 1449–1457. https://doi.org/10.1172/JCI24761
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules (Basel, Switzerland), 25(24), 5789. https://doi.org/10.3390/molecules25245789
- Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. Journal of visualized experiments : JoVE, (53), 2920. https://doi.org/10.3791/2920

- Buckner, R. L. (2004). Memory and executive function in aging and AD: Multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron*, *44*(1), 195–208. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.006
- Cao, H., Garcia, F., & Mcniven, M. A. (1998). Differential Distribution of Dynamin Isoforms in Mammalian Cells. Molecular Biology of the Cell, 9(9), 2595–2609. https://doi.org/10.1091/mbc.9.9.2595
- Cabrera, A., Martínez Pérez, M. J., Gutiérrez Ravelo, R., Hakim Rodríguez, A., & Pérez Davison, D. (2014). Patogenia y tratamientos actuales de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Farmacia, 48*(3), 508–518. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152014000300016
- Carlos, C. C. (s. f.). *Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer*. Recuperado el 28 de febrero de 2025, de https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200104
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). Capítulo 2 - Comportamiento animal. En *Guía de técnicas de investigación en neurociencia* (2.a ed.). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800511-8.00002-2
- Carvajal Carvajal, C. (2016). Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Medicina Legal de Costa Rica, 33*(2), 104–122. Recuperado el 28 de febrero de 2025, de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200104&lng=en&tlng=es
- Chem-Impex International. (s.f.). *2-[(2,4-Dinitrophenyl)amino]ethyl 4-(phenylamino)butanoate [Chemical structure]*. Chem-Impex. Recuperado el 18 de julio de 2025, de https://www.chemimpex.com/es/products/38306
- Ciencia y Salud. (2024, 4 de julio). *La FDA aprobó un nuevo fármaco para ralentizar el avance del Alzheimer*. https://cienciaysalud.cl/2024/07/04/la-fda-aprobo-un-nuevo-farmaco-para-ralentizar-el-avance-del-alzheimer/
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 33(1), 18–41. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., & Zhong, K. (2019). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions, 5, 272–293. https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.05.008
- De-Paula, V. J., Radanovic, M., Diniz, B. S., & Forlenza, O. V. (2012). Alzheimer's disease. Sub-cellular biochemistry, 65, 329–352. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_14
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. Annals of Neurology, 27(5), 457–464. https://doi.org/10.1002/ana.410270502
- Dent, E. W., Merriam, E. B., & Hu, X. (2011). The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. Current opinion in neurobiology, 21(1), 175–181. https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.08.013
- Dorostark, M. M., Zou, C., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. Acta neuropathologica, 130(1), 1–19. https://doi.org/10.1007/s00401-015-1449-5
- Emad, N. A., Ahmed, B., Alhalmi, A., Alzobaidi, N., & Al-Kubati, S. S. (2021). Recent progress in nanocarriers for direct nose to brain drug delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 64, 102642.
- Eugenomic. (2020, 4 de septiembre). *Polimorfismo genético (SNP) - Eugenomic*. https://eugenomic.com/recursos/glosario/polimorfismo/

- Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., & LaFerla, F. M. (2017). Synaptic impairment in Alzheimer's disease: A dysregulated symphony. *Trends in Neurosciences*, 40(6), 347–357. https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.04.002
- Garcilazo, J. L., Verdier, A. Z., Avila, B. S. P., Galindo, I. X. M., Monzón, J. I. H., Ventura, F. A. L., Cortes, E. J., & Díaz, J. V. N. (2024, 2 octubre). La tinción de Golgi en la comprensión del sistema nervioso. https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/4274
- Garre-Olmo J. (2018). Epidemiologia de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. Revista de neurologia, 66(11), 377–386.https://neurologia.com/articulo/2017519
- González-Jamett, A. M., Momboisse, F., Haro-Acuña, V., Bevilacqua, J. A., Caviedes, P., & Cárdenas, A. M. (2013). Dynamin-2 function and dysfunction along the secretory pathway. Frontiers in endocrinology, 4, 126. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00126
- González-Jamett, A. M., Haro-Acuña, V., Momboisse, F., Caviedes, P., Bevilacqua, J. A., & Cárdenas, A. M. (2014). Dynamin-2 in nervous system disorders. Journal of Neurochemistry, 128(2), 210–223. https://doi.org/10.1111/jnc.12455
- Gordon-Weeks, P. R., & Fournier, A. E. (2014). Neuronal cytoskeleton in synaptic plasticity and regeneration. Journal of neurochemistry, 129(2), 206–212. https://doi.org/10.1111/jnc.12502 https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.12502
- Gould, T.D., Dao, D.T., Kovacsics, C.E. (2009). Prueba de campo abierto. En: Gould, T. (eds) Fenotipos relacionados con el estado de ánimo y la ansiedad en ratones. Neuromethods, vol. 42. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- Gundu, C., Arruri, V. K., Yadav, P., Navik, U., Kumar, A., Amalkar, V. S., Vikram, A., & Gaddam, R. R. (2022). Dynamin-Independent Mechanisms of Endocytosis and Receptor Trafficking. Cells, 11(16), 2557. https://doi.org/10.3390/cells11162557
- Hering, H., & Sheng, M. (2001). Espinas dendríticas: estructura, dinámica y regulación. *Nature Reviews Neuroscience, 2*, 880–888. https://doi.org/10.1038/35104061
- Hill, T., Odell, L. R., Edwards, J. K., Graham, M. E., McGeachie, A. B., Rusak, J., Quan, A., Abagyan, R., Scott, J. L., Robinson, P. J., & McCluskey, A. (2005). Small molecule inhibitors of dynamin I GTPase activity: Development of dimeric tyrphostins. Journal of Medicinal Chemistry, 48(24), 7781–7788. https://doi.org/10.1021/jm040208l
- INE - Instituto Nacional de Estadística. (s. f.). Tasa de población con discapacidad que tiene diagnosticadas determinadas enfermedades crónicas según la enfermedad por edad y sexo. INE. https://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t15/p418/a2008/hogares/p01/modulo1/&file=02032.px&L=0
- Kamagata E, Kudo T, Kimura R, Tanimukai H, Morihara T, Sadik MG, Kamino K, Takeda M. Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters Abeta metabolism. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Feb 13;379(3):691-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.147. Epub 2009 Jan 4. PMID: 19126407.
- Kelly, B. L., Vassar, R., & Ferreira, A. (2005). β-amyloid-induced dynamin 1 depletion in hippocampal neurons: A potential mechanism for early cognitive decline in Alzheimer disease. Journal of Biological Chemistry, 280(36), 31746–31753. https://doi.org/10.1074/jbc.M503259200
- Kevenaar, J. T., & Hoogenraad, C. C. (2015). The axonal cytoskeleton: from organization to function. Frontiers in molecular neuroscience, 8, 44. https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00044
- Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. Current neuropharmacology, 18(11), 1106–1125. https://doi.org/10.2174/1570159X18666200528142429

- Kirkpatrick, L. L., & Brady, S. T. (1999). Molecular Components of the Neuronal Cytoskeleton. Basic Neurochemistry - NCBI Bookshelf. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28122/
- Kovacs G. G. (2017). Tauopathies. Handbook of clinical neurology, 145, 355–368. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0
- Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1916, 99–103. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Laiman, J., Lin, S. S., & Liu, Y. W. (2023). Dynamins in human diseases: Differential requirement of dynamin activity in distinct tissues. *Current Opinion in Cell Biology, 81*, 102174. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102174
- Lamprecht R. (2021). Actin Cytoskeleton Role in the Maintenance of Neuronal Morphology and Long-Term Memory. Cells, 10(7), 1795. https://doi.org/10.3390/cells10071795
- López, F. M. (2001). El péptido β-amiloide: mecanismos de neurotoxicidad. Neuroprotección por antioxidantes y estrógenos. Revista Española de Geriatría y Gerontología, 36(2), 109-116.
- Lueptow L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (126), 55718. https://doi.org/10.3791/55718
- Ma, C., Hong, F., & Yang, S. (2022). Amyloidosis in Alzheimer's Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. Molecules (Basel, Switzerland), 27(4), 1210. https://doi.org/10.3390/molecules27041210
- Martínez, S., Ochoa, B., Pérez, M. R., Torrico, F., García, I., & Garcia, C. C. (2022). Apolipoprotein E polymorphisms in adults over 60 years of age with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease in different Venezuelan populations. Polimorfismos del gen de la apolipoproteína E en adultos mayores de 60 años con disminución de la memoria cognitiva y enfermedad de Alzheimer en diferentes poblaciones venezolanas. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud, 42(Sp. 1), 116–129. https://doi.org/10.7705/biomedica.5889
- McCluskey, A., Daniel, J. A., Hadzic, G., Chau, N., Clayton, E. L., Mariana, A., et al. (2004). Small molecule inhibitors of dynamin I GTPase activity: Development of dimeric tyrphostins. Journal of Medicinal Chemistry, 47(16), 4661–4670. https://doi.org/10.1021/jm040208l
- Menon M, Schafer DA. Dynamin: expanding its scope to the cytoskeleton. Int Rev Cell Mol Biol. 2013;302:187-219. doi: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00003-0. PMID: 23351711.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (s. f.). *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*. Recuperado el 27 de agosto de 2024, de https://diprece.minsal.cl/informacion-para-la-comunidad-enfermedad-de-alzheimer-y-otras-demencias/
- National Center for Biotechnology Information. (s. f.). *DNM2 dynamin 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. NCBI. Recuperado el 23 de agosto de 2025, de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1785
- National Institute on Aging. (s. f.). *La genética de la enfermedad de Alzheimer*. https://www.nia.nih.gov/espanol/alzheimer-causas-factores-riesgo/genetica-enfermedad-alzheimer
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3
- Othman, M. Z., Hassan, Z., & Che Has, A. T. (2022). Morris water maze: a versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. Experimental animals, 71(3), 264–280. https://doi.org/10.1538/expanim.21-0120

- 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
- Pelucchi, S., Stringhi, R., & Marcello, E. (2020). Dendritic spines in alzheimer's disease: How the actin cytoskeleton contributes to synaptic failure. In International Journal of Molecular Sciences (Vol. 21, Issue 3, p. 908).
- Peters, A., Sethares, C., & Luebke, J. I. (2008). Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. Neuroscience, 152(4), 970–981. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.07.014
- Pombal, M. M. P. M. M. Á. (s. f.). Técnicas Histológicas. Protocolos y recetas. Golgi en Corte. Atlas de Histologia Vegetal y Animal. https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-impregnacion-golgi-corte.php
- Qin, Q., Yin, Y., Wang, Y., Lu, Y., Tang, Y., & Jia, J. (2020). Gene mutations associated with early onset familial Alzheimer's disease in China: An overview and current status. *Molecular Genetics & Genomic Medicine, 8*(10), e1443. https://doi.org/10.1002/mgg3.1443
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–344. https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142
- Sanchez-Arias, J. C., Liu, M., Choi, C. S. W., Ebert, S. N., Brown, C. E., & Swayne, L. A. (2019). Pannexin 1 regulates network ensembles and dendritic spine development in cortical neurons. *eNeuro*, *6*(3). https://doi.org/10.1523/ENEURO.0452-18.2019
- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: A review of ultrastructural studies. Neurobiology of Aging, 24(8), 1029–1046. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.03.002
- Schell, C., & Huber, T. B. (2017). The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. Journal of the American Society of Nephrology : JASN, 28(11), 3166–3174. https://doi.org/10.1681/ASN.2017020143
- Schiffer, M., Teng, B., Gu, C., Shchedrina, V. A., Kasaikina, M., Pham, V. A., Hanke, N., Rong, S., Gueler, F., Schroder, P., Tossidou, I., Park, J. K., Staggs, L., Haller, H., Erschow, S., Hilfiker-Kleiner, D., Wei, C., Chen, C., Tardi, N., Hakroush, S., … Sever, S. (2015). Pharmacological targeting of actin-dependent dynamin oligomerization ameliorates chronic kidney disease in diverse animal models. Nature medicine, 21(6), 601–609. https://doi.org/10.1038/nm.3843
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (96), e52434. https://doi.org/10.3791/52434
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608. https://doi.org/10.15252/emmm.201606210
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594), 789–791. https://doi.org/10.1126/science.1074069
- Sheng, M., Sabatini, B. L., & Südhof, T. C. (2012). Synapses and Alzheimer's disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 4(5), a005777. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005777
- Sims, J. R., Zimmer, J. A., Evans, C. D., Lu, M., Ardayfio, P., Sparks, J., Wessels, A. M., Shcherbinin, S., Wang, H., Monkul Nery, E. S., Collins, E. C., Solomon, P., Salloway, S., Apostolova, L. G., Hansson, O., Ritchie, C., Brooks, D. A., Mintun, M., Skovronsky, D. M., & TRAILBLAZER-ALZ 2 Investigators (2023). Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. JAMA, 330(6), 512–527. https://doi.org/10.1001/jama.2023.13239

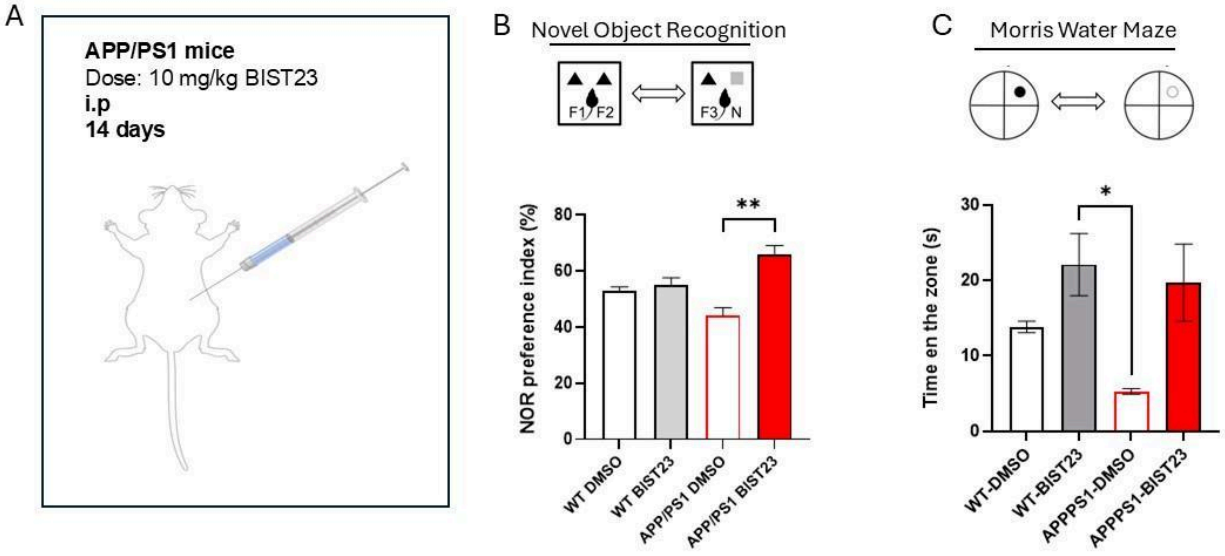
- Stefen, H., Chaichim, C., Power, J., & Fath, T. (2016). Regulation of the Postsynaptic Compartment of Excitatory Synapses by the Actin Cytoskeleton in Health and Its Disruption in Disease. Neural plasticity, 2016, 2371970. https://doi.org/10.1155/2016/2371970
- Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research, 289*, 29–38. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.004
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13515–13522. https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13515
- Squire, L. R., Wixted, J. T., & Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(11), 872–883. https://doi.org/10.1038/nrn2154
- Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2*(10), a006296. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Annals of Neurology, 30(4), 572–580. https://doi.org/10.1002/ana.410300410
- Tratamientos. (s. f.). Alzheimer's Disease And Dementia. https://www.alz.org/alzheimer-demencia/tratamientos
- Trevino, J. T., Quispe, R. C., Khan, F., & Novak, V. (2020). Non-Invasive Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery. Journal of clinical trials, 10(7), 439.
- Wang, Z., Xiong, G., Tsang, W. C., Schätzlein, A. G., & Uchegbu, I. F. (2019). Nose-to-Brain Delivery. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 370*(3), 593–601. https://doi.org/10.1124/jpet.119.258152
- Wicki-Stordeur, L. E., Boyce, A. K. J., & Swayne, L. A. (2013). Analysis of a pannexin 2–pannexin 1 chimeric protein supports divergent roles for pannexin C-termini in cellular localization. *Cell Communication & Adhesion*, *20*(3–4), 73–79. https://doi.org/10.3109/15419061.2013.844741
- World Health Organization: WHO & World Health Organization: WHO. (2023, 15 marzo). Demencia. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia
- Yesavage, J. A., Brooks, J. O. III, Taylor, J., & Tinklenberg, J. (1993). Development of aphasia, apraxia, and agnosia and decline in Alzheimer's disease. *American Journal of Psychiatry*, *150*(5), 742–747.

9. ANEXOS

Anexo N°1: Fármacos actualmente utilizados y aprobados por la FDA para tratar la EA. Información obtenida de Alzheimer's Association, 2024.

Nombre del fármaco	Aprobado para	Efecto terapéutico y/o mecanismo de acción	Año de aprobación
Donanemab	Enfermedad de Alzheimer temprana y deterioro cognitivo leve (DCL).	Elimina la proteína beta-amiloide, que interfiere con la comunicación neuronal.	2024
Lecanemab	Enfermedad de Alzheimer temprana y DCL.	Elimina la proteína beta-amiloide.	2023
Aducanumab	Enfermedad de Alzheimer temprana y DCL.	Elimina la proteína beta-amiloide.	2021
Donepezilo	Todas las etapas	Inhibidor de la colinesterasa. Previenen la ruptura de acetilcolina, un mensajero químico que es importante para la memoria y el aprendizaje.	1996
Galantamina	Leve a moderada	Inhibidor de la colinesterasa. Previenen la degradación de acetilcolina.	2001
Memantina	Moderada a grave	Antagonista del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), que actúa regulando la actividad del glutamato, un importante neurotransmisor del cerebro involucrado en el aprendizaje y la memoria. La adhesión del glutamato a los receptores de la superficie celular llamados receptores NMDA permite que el calcio ingrese a la célula. Las células dañadas pueden liberar demasiado glutamato, lo que lleva a una sobreexposición crónica al calcio, lo que puede acelerar el daño celular.	2003
Rivastigmina	Todas las etapas	Inhibidor de la colinesterasa. Previenen la ruptura de acetilcolina.	2000

Anexo N°2: Datos preliminares obtenidos en el Laboratorio de Fisiopatología Neuromuscular de la Universidad de Valparaíso (LAFINEM) que muestran efectos positivos del BIST23 administrado vía intraperitoneal en ratones APP/PS1 doble transgénico para la Enfermedad de Alzheimer (tesis de Bárbara Gómez).



Anexo N°3: Acta de aprobación bioética BEA 192-23 del proyecto FONDECYT 1231511.

Universidad de Valparaíso CHILE

6 AÑOS ACREDITADA NIVEL DE EXCELENCIA
Gestión Institucional, Docencia de Pregrado Investigación, Vinculación con el Medio y Docencia de Postgrado
HASTA MARZO DE 2029
Comisión Nacional de Acreditación Chile

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 siguiente:

- 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.

UNIVERSIDAD DE VALPARAISO COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES

Dr. Ramón Sotomayor Zárate
Instituto De Fisiología
Facultad De Ciencias
Universidad Valparaiso

Presidente CICUAL-UV