



Toxicidad del beta-amiloide durante el envejecimiento: influencia del metabolismo energético sinaptosomal

Ricardo Quiroz-Baez,^a Clorinda Arias^b

Toxicity of beta-amyloid protein during aging: Influence of synaptosomal energy metabolism

Background: Recent evidence suggests that early neurodegenerative events associated with Alzheimer's disease (AD) probably begin in the synaptic terminal, where it has been reported a large accumulation of β -amyloid protein ($A\beta$), one of the main factors described in the development of AD. We analyzed the influence of energy metabolism on the toxic effects of $A\beta$ during aging on synaptosomes from neocortex and hippocampus of rats exposed to inhibitors of glycolytic and mitochondrial metabolism and we evaluated the protective effects of some antioxidant compounds.

Methods: Synaptosomes were obtained by differential centrifugation in sucrose gradients and their redox activity was determined with the MTT assay.

Results: The mitochondrial activity of synaptosomes from young rats was not altered by the presence of $A\beta$; the ones obtained from old rats showed an increase in susceptibility to $A\beta$; this activity was greater in the synaptic terminals of the hippocampus.

Conclusions: These results provide experimental support for the hypothesis that certain risk factors, such as energy metabolism dysfunction or the aging process itself, may increase vulnerability to $A\beta$. Hippocampal region is more susceptible to $A\beta$ and its effect increases with age in relation to the neocortex, which would agree with the damage gradient reported in the AD.

Keywords Palabras clave

Alzheimer Disease	Enfermedad de Alzheimer
Amyloid beta protein	Proteína beta amiloide
Synaptosomes	Sinaptosomas

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un problema de salud pública que se agravará debido a que la expectativa de vida de las personas tiende a aumentar a nivel mundial.^{1,2} La EA es la demencia neurodegenerativa de mayor frecuencia, pues afecta aproximadamente al 2% de la población en países industrializados y de forma predominante a las personas mayores de 70 años. Algunas proyecciones epidemiológicas apuntan que para el 2050, 68% de los 131.5 millones de casos de demencia se encontrarán en países en desarrollo, como México. En el año 2015 la Secretaría de Salud reportó 860 mil casos a nivel nacional y, según datos recientes, nuestro país vive un envejecimiento acelerado, pues mientras en 2010 las personas de 65 años o más representaban un 6% de la población, en el 2016 aumentaron a un 15%. La prevalencia de esta enfermedad es del 3% en individuos entre 60 y 70 años, lo cual alcanza un 40% en personas mayores de 85 años.³

La EA se caracteriza por la presencia de depósitos extraneuronales de proteína beta-amiloide ($A\beta$) y marañas neurofibrilares de proteína tau intracelulares,⁴ así como por una pérdida sináptica y neuronal. La disminución en la densidad sináptica se refleja en la pérdida de la mayoría de los componentes de las vesículas sinápticas y los péptidos almacenados en estas.⁵ Esta pérdida sináptica puede llegar a ser hasta de un 75% en el hipocampo y parece ser un evento previo a la muerte neuronal.⁶ De hecho, la pérdida de la proteína sinaptotifina, la cual está asociada a las terminales sinápticas, es un evento temprano en la EA.

El papel de la proteína beta-amiloide en la patogenia de la EA se ha visto apoyado por su asociación tanto con la EA familiar como esporádica. Experimentos *in vitro* han mostrado que la proteína beta-amiloide y su fragmento activo 25-35 ($A\beta_{25-35}$) poseen efectos neurotóxicos directos o exacerban los efectos dañinos de otros insultos neurotóxicos. Una de las alteraciones más consistentes en la EA es la reducción en el consumo de glucosa previo al daño neuronal. Varios grupos han reportado, en el cerebro de pacientes con EA, una disminución en la utilización de glucosa, lo cual

^aDepartamento de Investigación Básica, Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Geriátrica, Institutos Nacionales de Salud, Secretaría de Salud

^bDepartamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad de México, México

Comunicación con: Ricardo Quiroz-Baez
Teléfono: (55) 5519 2724, extensión 106
Correo electrónico: rquiroz@inger.gob.mx

Recibido: 15/08/2017

Aceptado: 15/11/2017

Introducción: evidencia reciente sugiere que eventos neurodegenerativos tempranos asociados con la enfermedad de Alzheimer (EA) probablemente se inicien en la terminal sináptica, en donde se observa una gran acumulación de la proteína β -amiloide ($A\beta$), uno de los factores involucrados en el desarrollo de la EA. Estudiamos la influencia del metabolismo energético en los efectos tóxicos de la $A\beta$ en el envejecimiento en sinaptosomas de neocorteza e hipocampo de ratas expuestas a inhibidores del metabolismo glucolítico y mitocondrial, y evaluamos los efectos protectores de algunos antioxidantes.

Métodos: los sinaptosomas se obtuvieron por centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa y su

actividad óxido-reductora se determinó con la técnica de MTT.

Resultados: la actividad mitocondrial de los sinaptosomas de ratas jóvenes no se alteró por la presencia de la $A\beta$; los de ratas viejas mostraron un aumento en la susceptibilidad a la $A\beta$, el efecto fue mayor en las terminales sinápticas del hipocampo.

Conclusiones: los resultados sustentan la hipótesis de que ciertos factores de riesgo, como las disfunciones del metabolismo energético o el proceso de envejecimiento, pueden incrementar la vulnerabilidad a la $A\beta$ y su efecto se incrementa con la edad en relación con la neocorteza, lo cual concordaría con el gradiente de daño reportado en la EA.

Resumen

relaciona un mayor grado de demencia con una reducción mayor del metabolismo energético.⁷ También se ha encontrado que aquellos pacientes predispuestos genéticamente a la EA tienden a desarrollar cambios en el metabolismo cerebral antes de iniciar con la sintomatología.⁸ Es interesante el hecho de que aquellos pacientes con impedimento cognoscitivo leve y una reducción en el metabolismo energético cerebral frecuentemente desarrollan EA; adicionalmente, se ha propuesto que la reducción del metabolismo glucolítico podría vaticinar el desarrollo de deficiencias cognoscitivas en sujetos normales envejecidos.^{9,10}

Para estudiar el papel de las deficiencias en el metabolismo energético dentro de los procesos neurodegenerativos, en el presente trabajo utilizamos compuestos capaces de generar daño metabólico en las terminales sinápticas y mimetizar así una deficiencia energética. El primero de estos es el ácido 3-nitropropiónico (3-NP), el cual es una toxina que interfiere con la síntesis de ATP, al inhibir a la enzima succinato deshidrogenasa, con lo cual induce el desacoplamiento mitocondrial. El otro compuesto seleccionado es el inhibidor irreversible de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, yodo acetato (IA). Además, se evaluó el efecto protector de moléculas con diversas propiedades (sustrato energético, piruvato; antioxidante, vitamina E; y un atrapador de radicales libres, la alfa-fenil-N-ter-butil nitrona [PBN]).

Métodos

Obtención de sinaptosomas

Se utilizaron ratas Wistar machos de tres meses y 20-24 meses de edad, con base en los lineamientos de investigación en materia de salud (Secretaría de Salud, México), con la aprobación del Comité Local de Ética

para el Manejo de Animales. La purificación de la fracción sinaptosomal se realizó mediante centrifugaciones diferenciales, a partir de la modificación del método de Löscher.¹¹ Tanto la corteza como el hipocampo se disecaron en frío; los tejidos fueron homogenizados por separado en una solución de sacarosa 0.32 M y HEPES 5 mM, pH 7.2. Los homogenizados se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en 1 mL de sacarosa 1.2 M y se centrifugó a 50 000 rpm durante 30 minutos. Se colectó la interface del gradiente y se llevó a un volumen de 2 mL con sacarosa 0.32 M. Finalmente la fracción se colocó sobre 1 mL de sacarosa 0.8 M y se centrifugó a 50 000 rpm durante 30 minutos. El *pellet*, correspondiente a la fracción sinaptosomal, fue resuspendido en *buffer Locke* conformado por (mM): NaCl 154, KCl 5.6, CaCl₂ 2.3, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 3.6, glucosa 5, HEPES 5 a pH 7.2. Las alícuotas contuvieron 50 μ g de proteína sinaptosomal y se incubaron a 37 °C en un baño con agitación durante tres horas bajo los distintos tratamientos: fragmento activo 25-35 de péptido beta-amiloide ($A\beta$ 25-35) 50 μ M en presencia o ausencia de IA 5 μ M, 3-NP 10 μ M y de las diferentes combinaciones con piruvato 1 mM, vitamina E 250 μ M y PBN 10 μ M.

Evaluación de la actividad óxido-reductora mitocondrial

La actividad de la cadena respiratoria mitocondrial se evaluó mediante la cuantificación de las sales de formazán, generadas a partir de la reducción del 3-(3,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazolio (MTT), un compuesto soluble capaz de incorporarse a las mitocondrias por la acción de deshidrogenasas en presencia de NADH.¹² Transcurrido el periodo de incubación de los sinaptosomas con las diferentes condiciones experimentales, se agregó MTT (5% v/v) a una concentración final de 10 mM y se incubaron durante una hora más. Finalmente las muestras se

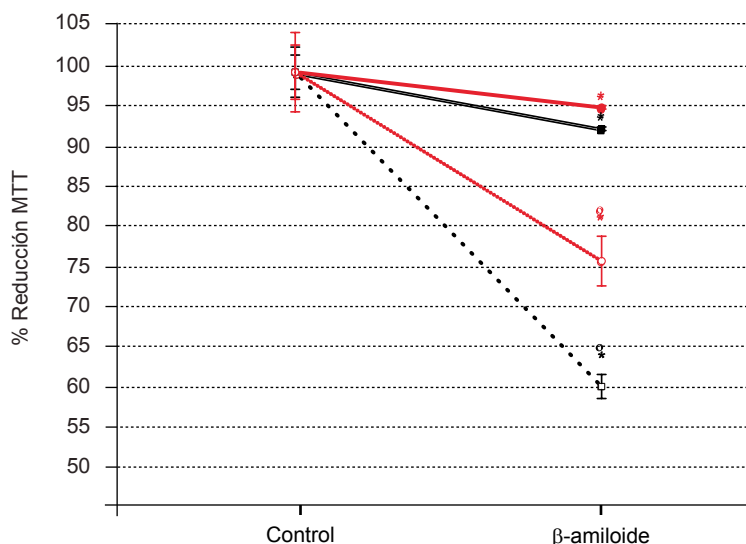
centrifugaron a 5000 rpm durante cinco minutos y se agregaron 500 μ l de isopropanol ácido. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Estadística

Los resultados mostrados representan el promedio de 5 a 10 experimentos independientes \pm error estándar (ES). Las diferencias significativas se obtuvieron al analizar los datos con análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba *post-hoc* Bonferroni y Tukey, en el programa Origin 5.0.

Resultados

En la primera serie experimental comparamos el efecto de la exposición al $A\beta_{25-35}$ 50 μ M sobre la susceptibilidad tejido-específica de terminales sinápticas de corteza cerebral e hipocampo a partir de animales de tres y 20-24 meses de edad. Como se muestra en la figura 1, los sinaptosomas obtenidos de animales jóvenes no muestran un efecto importante sobre su actividad mitocondrial al ser expuestos al $A\beta_{25-35}$, mientras que en los sinaptosomas de 20-24 meses de edad la sola presencia de $A\beta_{25-35}$ es capaz de inducir una importante reducción de la actividad óxido-reductora mitocondrial, aun en condiciones basales. Es de resaltar que los sinaptosomas derivados de tejido hipocampal muestran una mayor susceptibilidad (\downarrow 37.9%) en comparación con aquellos que son corticales (\downarrow 22.8%).



Control * $p < 0.001$; joven $\circ p < 0.001$

Figura 1 Efecto de la $A\beta_{25-35}$ sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas de tres y 20-24 meses. Los datos representan el porcentaje en relación con el control \pm SEM de tres determinaciones independientes hechas por triplicado

A partir de los resultados anteriores decidimos analizar el efecto del envejecimiento sobre la susceptibilidad sináptica hacia la $A\beta_{25-35}$ y nos enfocamos en las terminales nerviosas obtenidas de ratas de 20-24 meses de edad. Los sinaptosomas obtenidos de estos animales fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales, previamente reportadas por nuestro grupo en el caso de los sinaptosomas obtenidos de las ratas jóvenes,^{13,14} tales como la exposición a dos inhibidores del metabolismo energético, como el IA (5 μ M) y el 3-NP (10 μ M), así como a compuestos con actividad antioxidantes como el piruvato (1 mM) y la vitamina E (250 μ M) o con capacidad de atrapar radicales libres, PBN (10 μ M). Dichos tratamientos nos permitieron determinar algunas condiciones capaces de potenciar o reducir los efectos tóxicos de la $A\beta_{25-35}$.

Para el caso de los sinaptosomas hipocampales obtenidos a partir de ratas viejas, la exposición a la $A\beta_{25-35}$ indujo una inhibición de la actividad mitocondrial del 37.9% en comparación con los sinaptosomas control (ver panel superior de figura 2). El PBN redujo la actividad mitocondrial en un 7.7%, en tanto el piruvato la mantuvo alrededor de los niveles control (105.9%). La vitamina E indujo un incremento en la actividad mitocondrial del 132.1% en relación con los niveles basales del control.

Al incubar en presencia de IA la actividad mitocondrial cayó un 21.5%. Mientras que el PBN y el piruvato no presentaron un efecto protector (80.6% y 86.9%, respectivamente), la vitamina E fue capaz de revertir el efecto del IA, con lo que la actividad mitocondrial alcanzó niveles del 67.5% por encima del control.

EL tratamiento conjunto de la $A\beta_{25-35}$ y el IA no indujo un efecto sinérgico sobre la toxicidad de la $A\beta_{25-35}$, por lo que la inhibición de la actividad mitocondrial bajo estas condiciones fue del 37%, mismo porcentaje que el inducido por la $A\beta_{25-35}$ por sí misma. Bajo estas condiciones el PBN (61%) y el piruvato (65.2%) fueron incapaces de proteger del daño. En el caso de la vitamina E, esta fue capaz de revertir los efectos deletéreos del tratamiento conjunto mencionado, lo cual incrementó la actividad mitocondrial en un 14% por arriba de los niveles controles.

Los sinaptosomas de corteza cerebral obtenidos a partir de ratas viejas e incubados en presencia de $A\beta_{25-35}$ mostraron una inhibición de la actividad mitocondrial del 22.8% (figura 2, panel inferior). Bajo condiciones de control, la adición del PBN disminuyó la actividad mitocondrial un 8.3%, mientras el piruvato permitió alcanzar los niveles energéticos basales (99.3%). Al igual que en los casos anteriores, la vitamina E indujo un incremento en la actividad mitocondrial del 39%. Cuando estos sinaptosomas se incubaron en presencia de IA, la actividad mitocondrial

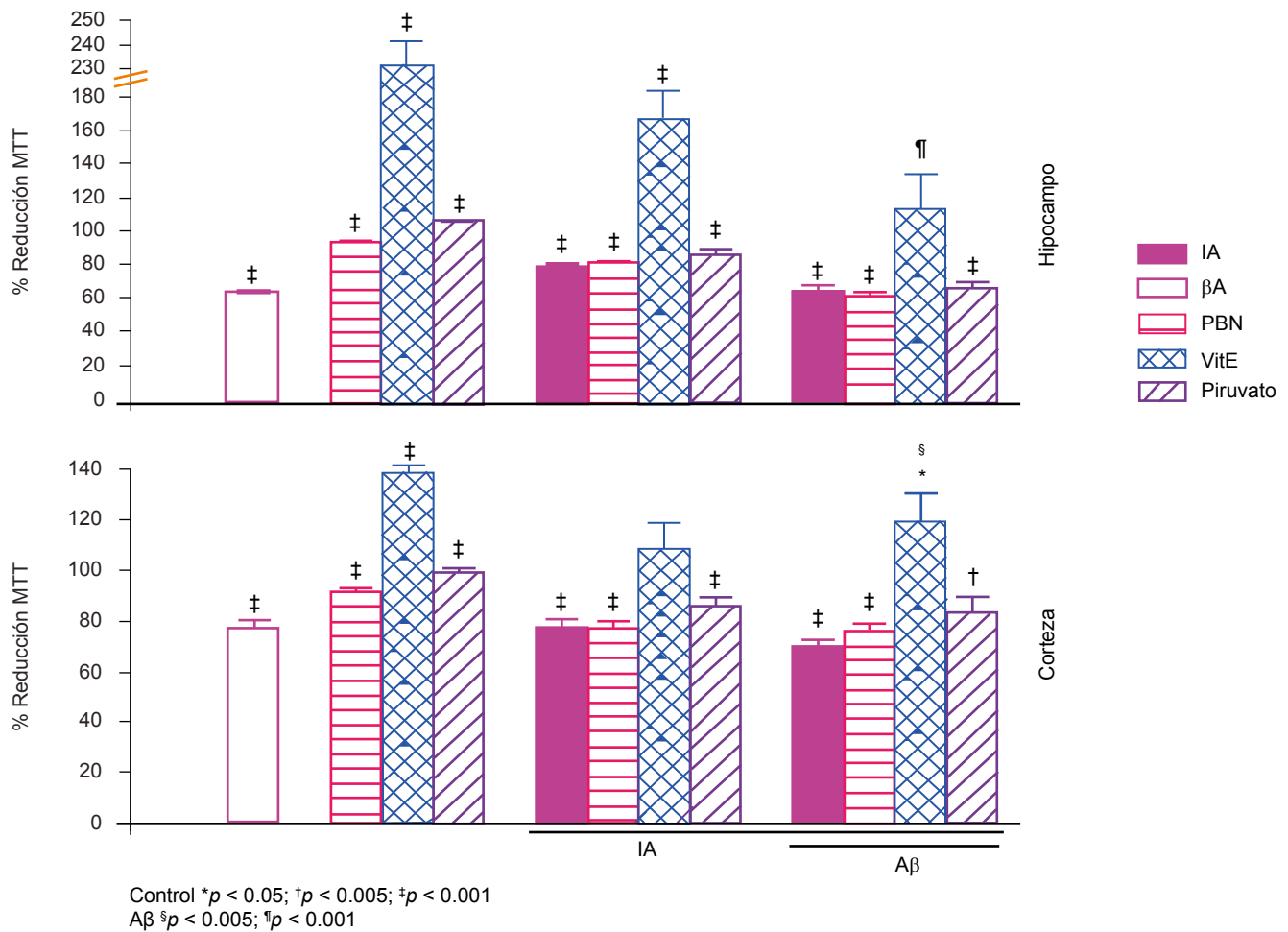


Figura 2 Efecto del IA sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas de 20-24 meses. Papel protector del PBN, la vitamina E y el piruvato en sinaptosomas de hipocampo (panel superior) y corteza cerebral (panel inferior) en presencia y ausencia de la A β_{25-35} . Los datos representan el porcentaje en relación con el control \pm SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado.

disminuyó un 22.5% respecto al control. De la misma forma que en los sinaptosomas del hipocampo tampoco se presentó una potenciación en el daño inducido por la A β_{25-35} . La vitamina E fue capaz de recuperar la actividad mitocondrial control (108.5%), en tanto el piruvato consiguió una protección parcial mínima (86.2%), aunque significativa estadísticamente. El PBN no mostró ningún efecto (77.2%).

El tratamiento conjunto de la A β_{25-35} y el IA redujeron la actividad mitocondrial en un 30.5%. Aunque esta reducción fue significativa en relación con la sola exposición a la A β_{25-35} , la potenciación de su toxicidad no fue tan importante en comparación con lo reportado en ratas jóvenes. Asimismo, tanto el PBN como el piruvato fueron incapaces de proteger del daño (76.3% y 83.6%, respectivamente). La presencia de la vitamina E llevó la actividad mitocondrial 19.7% por encima de los niveles control.

Los sinaptosomas aislados a partir del hipocampo de ratas viejas también fueron incubados en presencia de 3-NP (lo cual se muestra en la figura 3, panel superior) y se observó que la actividad mitocondrial decae un 15.5%. El PBN no fue capaz de proteger bajo estas condiciones (82.3%). En este caso, la vitamina E comprobó sus efectos benéficos al incrementar la actividad mitocondrial en un 39.9% por arriba de los valores control, mientras el piruvato demostró que tenía un efecto protector parcial (90.7%), el cual fue significativo estadísticamente.

EL tratamiento conjunto de la A β_{25-35} y el 3-NP redujo la actividad mitocondrial en un 27%. En este caso tanto el PBN (71.3%) como el piruvato (79%) fueron incapaces de proteger del daño. En cambio la vitamina E revirtió sus efectos, además de incrementar la actividad mitocondrial un 29.4% por encima de los niveles control.

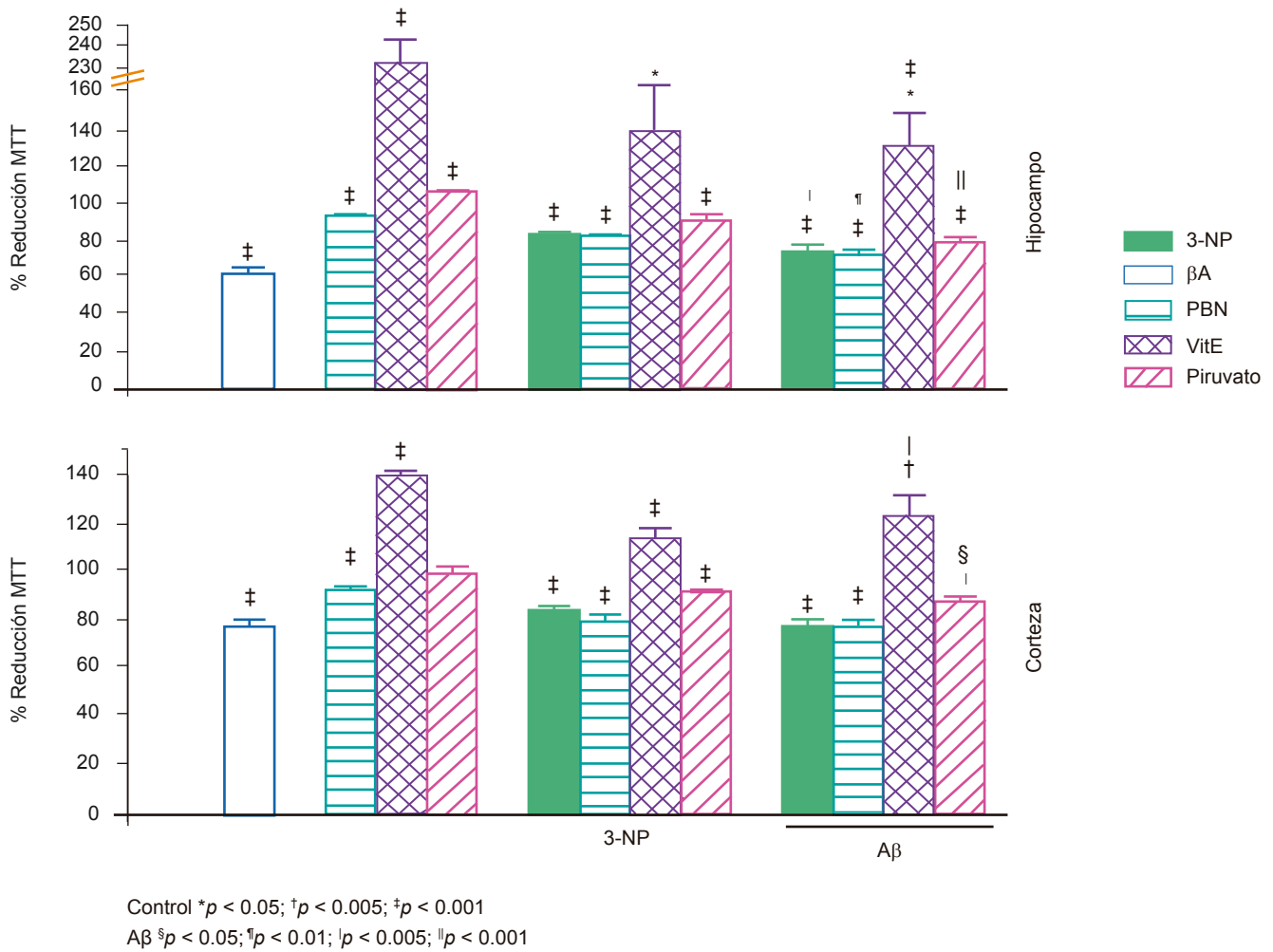


Figura 3 Efecto del 3-NP sobre la función mitocondrial de sinaptosomas aislados a partir de ratas de 20-24 meses. Papel protector del PBN, la vitamina E y el piruvato en sinaptosomas de hipocampo (panel superior) y corteza cerebral (panel inferior) en presencia y ausencia de la Aβ₂₅₋₃₅. Los datos representan el porcentaje en relación con el control ± SEM de 6-8 determinaciones independientes hechas por duplicado

También en la figura 3 se muestra el efecto del 3-NP sobre los sinaptosomas obtenidos de la corteza de ratas viejas, al reducir su actividad mitocondrial un 16.3%. La adición de PBN no mostró ningún efecto (79.3%). Con la presencia de piruvato se consiguió una protección parcial mínima (91.1%), la cual fue significativa estadísticamente. La vitamina E (113.7%) fue capaz de revertir el efecto del 3-NP.

El tratamiento conjunto de Aβ₂₅₋₃₅ y el 3-NP redujo la actividad mitocondrial en un 22.6%. Bajo estas condiciones el PBN no mostró ningún efecto protector (76.3%). La vitamina E fue capaz de revertir el daño e incrementar la actividad mitocondrial 23.1% por encima de los niveles control, en tanto el piruvato presentó una protección parcial bajo dichas condiciones (86.7%).

Al comparar los porcentajes de actividad de las muestras obtenidas a partir de los animales viejos (20-

24 meses) con los datos obtenidos en un estudio previo que nuestro grupo realizó en animales jóvenes (tres meses), se observa que dichos porcentajes no eran significativamente distintos entre sí. Por lo tanto se decidió analizar la razón de actividad viejos/jóvenes (V/J) y así comparar la actividad mitocondrial en respuesta a los distintos tratamientos entre ambas poblaciones.

En el cuadro I se muestra la razón V/J de la actividad óxido-reductora mitocondrial, al comparar las unidades crudas (unidades arbitrarias de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm), las cuales fueron obtenidas de los ensayos realizados tanto en sinaptosomas hipocampales como en los obtenidos a partir de la corteza cerebral (cuadro II) de animales viejos en relación con las mismas condiciones, pero en sinaptosomas de animales jóvenes. Se observa una evidente reducción de la actividad mitocondrial dependiente de la edad y de

manera tejido-específica. Los datos apuntan al hipocampo como la región más susceptible al daño.

Discusión

Se ha propuesto que las alteraciones primarias en la EA pueden ocurrir en las terminales sinápticas y ser uno de los eventos tempranos en la enfermedad.^{15,16} Así, el uso de sinaptosomas para estudiar los efectos nocivos de la proteína beta-amiloide de forma directa bajo condiciones metabólicas basales, o al inducir el desacoplamiento del metabolismo energético, puede ser de relevancia en el entendimiento de la etiología de la EA. Numerosos reportes señalan que la administración de la proteína beta-amiloide en la región del hipocampo conduce a severas alteraciones conductuales y bioquímicas, así como a la disminución de las capacidades cognitivas a largo plazo.¹⁷ El análisis global de nuestros resultados sugiere que la administración de la proteína beta-amiloide es capaz de inducir cambios en la función sináptica, mientras que la neurodegeneración inducida por esta proteína aparentemente requiere de factores adicionales, como la coadministración de excitotoxinas¹⁸ o de drogas que alteren el metabolismo glucolítico.^{19,20}

De manera interesante, a diferencia de lo reportado en sinaptosomas de animales jóvenes,^{13,14} la administración de la proteína beta-amiloide en terminales nerviosas de ratas viejas tiene un gran efecto por sí

Cuadro II Razón de actividad de animales viejos frente a jóvenes (V/J). Actividad óxido-reductora mitocondrial de sinaptosomas corticales

Corteza	Jóvenes	Viejos	Razón V/J
Control	499.6	337.2	0.675
PBN	449.9	309	0.687
Vit E	830.1	467.3	0.563
Piruvato	729.5	333.1	0.457
A β	478.4	258.7	0.541
IA	383.5	260	0.678
IA/PBN	397.6	260	0.654
IA/VitE	531.5	363.4	0.684
IA/Piruv	490	289.4	0.591
A β /IA	289.4	234.2	0.809
A β /IA/PBN	322.9	256.8	0.795
A β /IA/VitE	576.5	397.4	0.689
A β /IA/Piruv	442.4	279	0.631
3-NP	423.9	280.6	0.662
3-NP/PBN	429.3	266	0.620
3-NP/VitE	647.6	383.4	0.592
3-NP/Piruv	578.8	306.2	0.529
A β /3-NP	355.8	258.4	0.726
A β /3-NP/PBN	364.9	255.6	0.700
A β /3-NP/VitE	695.4	409.2	0.588
A β /3-NP/Piruv	490	290.6	0.593

Cuadro I Razón de actividad de animales viejos frente a jóvenes (V/J). Actividad óxido-reductora mitocondrial de sinaptosomas hipocámpales

Hipocampo	Jóvenes	Viejos	Razón V/J
Control	388.4	217.2	0.559
PBN	363.4	200.3	0.551
Vit E	789.5	500.4	0.634
Piruvato	545.6	230.1	0.422
A β	361.9	134.9	0.373
IA	289.9	171	0.59
IA/PBN	296.7	175.6	0.592
IA/VitE	565.4	361	0.638
IA/Piruv	328	189.4	0.577
A β /IA	215.2	137.8	0.64
A β /IA/PBN	223.2	133.2	0.597
A β /IA/VitE	609	242.4	0.398
A β /IA/Piruv	238.1	142.6	0.599
3-NP	307.1	182.8	0.595
3-NP/PBN	347.7	177.6	0.511
3-NP/VitE	673.4	294.4	0.437
3-NP/Piruv	483.2	195.8	0.405
A β /3-NP	250.4	158	0.631
A β /3-NP/PBN	238	154.6	0.650
A β /3-NP/VitE	719.4	273.8	0.381
A β /3-NP/Piruv	351.7	171	0.486

misma sobre la disminución de la capacidad óxido-reductora mitocondrial y esto posiblemente refleja cambios asociados al envejecimiento que inducen un manejo inadecuado de los insultos metabólicos, lo cual genera condiciones que favorecen la toxicidad de la proteína beta-amiloide. Entre estas condiciones pueden considerarse el incremento en la acumulación de especies reactivas de oxígeno, la disminución de la función mitocondrial debido a la acumulación de mutaciones en el ADNmt,²¹ un aumento en la carga de calcio interno²² y alteraciones en los mecanismos que regulan el metabolismo de neurotransmisores excitadores como el glutamato.²³ Así, el déficit energético producto del envejecimiento hace que la terminal sináptica sea más susceptible a los estímulos externos al disminuir sus capacidades homeostáticas. Sin embargo, la presencia de los inhibidores metabólicos no fue capaz de producir un efecto sinérgico estadísticamente significativo sobre la toxicidad de la proteína beta-amiloide (como el reportado en los sinaptosomas jóvenes). Esto podría explicarse como una consecuencia del bajo nivel metabólico basal presente en las muestras de 20-24 meses.

Nuestros resultados señalan que los sinaptosomas aislados a partir del hipocampo parecen ser más sensibles a los efectos de la proteína beta-amiloide, bajo las distintas condiciones experimentales, en compa-

ración con los obtenidos de la corteza cerebral. Esta mayor vulnerabilidad, bajo las condiciones anteriormente descritas, apoyaría el hecho de que el hipocampo es de las regiones que más tempranamente y con mayor intensidad se dañan en la EA. Adicionalmente, la toxina glucolítica, IA, parece incrementar de forma más potente la vulnerabilidad hacia la proteína beta-amiloide en comparación con la 3-NP. Estos resultados concuerdan con reportes previos, los cuales indican que en los sinaptosomas la glucosa es usada como la principal fuente energética, y adicionalmente, que el IA efectivamente reduce los niveles de ATP en los sinaptosomas.²⁴ Si algunas alteraciones en la producción energética son capaces de exacerbar la toxicidad inducida por la proteína beta-amiloide, como algunos otros estudios *in vitro* sugieren,¹⁹ entonces aquellos mecanismos que involucren alteraciones en la función mitocondrial dependiente de la edad, como serían una baja perfusión sanguínea cerebral, la acumulación de la proteína beta-amiloide, y mutaciones del ADN mitocondrial, pudieran contribuir a la patología de la EA.

De acuerdo con nuestros resultados, la administración de piruvato protege parcialmente del daño inducido por la proteína beta-amiloide, probablemente al restaurar parte de los niveles energéticos al actuar como sustrato del ciclo de los ácidos tricarbónicos después de su conversión a A-CoA. También se ha reportado que el piruvato es capaz de incrementar la respiración sinaptosomal, incluso en presencia de glucosa.²⁵

El uso de antioxidantes, como la vitamina E, ha sido reportado en varios modelos de muerte neuronal, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*.^{26,27} Así, la aplicación de vitamina E es capaz de proteger del daño neuronal inducido por el IA.²⁸ Actualmente, se le utiliza de manera frecuente en el tratamiento de distintas enfermedades (como las neurodegenerativas), ya sea con la intención de retrasar su desarrollo o con fines preventivos. Nuestros resultados confirman que la vitamina E protege ante el daño inducido por la proteína beta-amiloide, al igual que por el de los inhibidores metabólicos. Interesantemente, bajo condiciones de control la vitamina E fue capaz de estimular la actividad reductora mitocondrial. Este efecto podría explicarse debido a su acción protectora sobre el proceso normal de envejecimiento de la prepara-

ción sinaptosomal, directamente relacionado con su actividad antioxidante, o a través de un efecto directo al estimular la actividad mitocondrial. En el ciclo de óxido-reducción de la vitamina E, cuando esta se encuentra en un estado oxidado (radical tocoperóxido), parte de las formas reducidas de la coenzima Q se encargan de reducirla, lo cual regenera nuevamente la vitamina E; en consecuencia, se estimularía la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Sin embargo, para apoyar esta interpretación sería necesario valorar, a través de la tasa de respiración mitocondrial, este efecto positivo de la vitamina E.

A pesar de que diversos reportes confirman la eficiencia del PBN como un atrapador de radicales libres^{29,30} y neuroprotector,³¹ nuestros resultados muestran que el PBN no tuvo efectos benéficos sobre la preparación sinaptosomal, al inducir incluso una inhibición en la actividad óxido-reductora mitocondrial. Otros autores señalan que en los mecanismos de protección del PBN también están involucradas otras vías celulares, como la regulación de señales de transducción³² o efectos directos sobre la expresión genética.³³

Estos resultados sugieren que la terminal sináptica puede ser particularmente sensible a perturbaciones metabólicas, las cuales pueden exacerbar la toxicidad de la proteína beta-amiloide. De manera interesante, algunos datos sugieren que la sinapsis puede ser un sitio en donde inicie la cascada neurodegenerativa en la EA y, de hecho, la pérdida de sinaptofisina, una proteína asociada a la terminal sináptica, ha sido tomada como un marcador temprano de la neurodegeneración.³⁴ A pesar de que los mecanismos patogénicos que subyacen a la EA no se conocen del todo, estos datos dan un sustento experimental a la hipótesis de que ciertos factores de riesgo, como disfunciones metabólicas y la acumulación de la proteína beta-amiloide, podrían interactuar de manera exacerbada en la EA y que sustratos metabólicos, como el piruvato y compuestos antioxidantes, podrían funcionar como una herramienta terapéutica.

Declaración de conflicto de interés: los autores han completado y enviado la forma traducida al español de la declaración de conflictos potenciales de interés del Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas, y no fue reportado alguno que tuviera relación con este artículo.

Referencias

1. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005;366(9503):2112-7.
2. Alzheimer's Association. Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2009;5(3):234-70.
3. Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 2003;60:1119-22.
4. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002;298:789-91.
5. Arendt T. Alzheimer's disease as a disorder of mech-

- anisms underlying structural brain self-organization. *Neuroscience*. 2001;102:723-65.
6. Terry RD, Katzman R. Life span synapses will there be a primary senile dementia? *Neurobiol Aging*. 2000;22(3):347-8.
 7. Pietrini P, Alexander GE, Furey ML, Hampel H, Guazzelli M. The neurometabolic landscape of cognitive decline: in vivo studies with positron emission tomography in Alzheimer's disease. *Int J Psychophysiol*. 2000;37(1):87-98.
 8. Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, et al. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(11):6037-42.
 9. De Leon M, Bobinski M, Convit A, Wolf O, Insausti R. Usefulness of MRI measures of entorhinal cortex versus hippocampus in AD. *Neurology*. 2001;56(6):820-1.
 10. De Santi S, de Leon MJ, Rusinek H, Convit A, Tarshish CY, Roche A, et al. Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD. *Neurobiol Aging*. 2001;22(4):529-39.
 11. Löscher W. Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: Electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effect on nerve terminal gamma-aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem*. 1985;45:879-89.
 12. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
 13. Arias C, Montiel T, Quiroz-Báez R, Massieu L. Beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2002;176(1):163-74.
 14. Montiel T, Quiroz-Baez R, Massieu L, Arias C. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants. *Exp Neurol*. 2006;200(2):496-508.
 15. DeKosky ST, Scheff SW, Styren SD. Structural correlates of cognition in dementia: Quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration*. 1996;5:417-21.
 16. Terry RD, Masliah E, Hansen AH. Structural basis of the cognitive alterations. En: Terry DR, Katzman R and Bick KL, editores. *Alzheimer Disease*. New York, USA: Raven Press: 1994. pp. 179-96.
 17. Alvarez XA, Miguel-Hidalgo JJ, Fernández-Novoa L, Cacabelos R. Intrahippocampal injections of the beta-amyloid1-28 fragment induces behavioral deficits in rats. *Methods Exp Clin Pharmacol*. 1997;19:471-9.
 18. Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, Yamada N., Oda T, Kaneko I. Co-injections of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons. *Neuroscience*. 1998;84:479-87.
 19. Copani A, Koh JY, Cotman CW. Beta-Amyloid increases neuronal susceptibility to injury by glucose deprivation. *Neuroreport*. 1991;2:763-5.
 20. Smyth MD, Kesslack JP, Cummings BJ, Cotman CW. Analysis of brain injury following intrahippocampal administration of beta-amyloid in streptozotocin-treated rats. *Neurobiol Aging*. 1993;15:153-9.
 21. Yakes FM, Houten BV. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;95:514-9.
 22. Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Robert ED, Parks JK, Parker WD, et al. Calcium homeostasis and reactive oxygen species in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 1997;17(12):4612-22.
 23. Arias C, Arrieta I, Tapia R. Beta-Amyloid peptide fragment 25-35 potentiates the calcium-dependent release of excitatory amino acids from depolarized hippocampal slices. *J Neurosci Res*. 1995;1:561-6.
 24. Kauppinen RA, Nicholls DG. Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and response to hypoglycaemia. *Eur J Biochem*. 1986;158:159-65.
 25. Rafalowska U, Erecinska M, Wilson DF. The effect of acute hypoxia on synaptosomes from rat brain. *J Neurochem*. 1980;34:1160-5.
 26. Cardoso SM, Pereira C, Oliveira CR. The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radicals mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Comm*. 1998;246:703-10.
 27. Muller DPR, Loyd JK, Wolff OH. Vitamin E and neurological function. *Lancet*. 1983;1:225-8.
 28. Uto A, Dux E, Kusumoto M, Hossmann K-A. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J Neurochem*. 1995;64:2185-91.
 29. Janzen EG, Blackburn BJ. Detection and identification of short-lived free radicals by electron spin resonance trapping techniques (spin trapping): photolysis of organolead -tin and -mercury compounds. *J Am Chem Soc*. 1996;91:4481-90.
 30. Novelli GP, Angiolini P, Tani P. Phenyl-t-butyl-nitron is active against traumatic shock in rats. *Free Radic Res Commun*. 1985;1:321-7.
 31. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 1990;4:2587-97.
 32. Idecola C, Zhang F, Casey R. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficit s in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci*. 1997;17:9157-64.
 33. Floyd RA. Protective action of nitron-based free radical traps against oxidative damage to central nervous system. *Adv Pharmacol*. 1997;38:361-78.
 34. Masliah E, Terry RD, Alford M, De Teresa R, Hansen LA. Cortical and subcortical patterns of synaptophysin-like immunoreactivity in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1991;138:235-46.