



**AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT PROOXIDANT DE L'ALUMINI EN RATOLINS
TG2576. PAPER PROTECTOR DE LA MELATONINA I DE LA
DESFEROXAMINA
Tània Garcia Soldevila**

**ISBN: 978-84-694-1243-5
Dipòsit Legal: T-319-2011**

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TANIA GARCIA SOLDEVILA

Avaluació de l'activitat prooxidant de l'alumini en ratolins
Tg2576. Paper protector de la melatonina i de la
desferoxamina

TESI DOCTORAL

dirigida per María Mercedes Gómez Arnaiz
i José Luís Domingo Roig

Departament de Psicologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus
2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT PROOXIDANT DE L'ALUMINI EN L'ACTOLINS TG2576. PAPER PROTECTOR DE LA MELATONINA
I DE LA DESFEROXAMINA

Tània García Soldevila

ISBN:978-84-694-1243-5/DL:T-319-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT PROOXIDANT DE L'ALUMINI EN L'ACTOLINS TG2576. PAPER PROTECTOR DE LA MELATONINA
I DE LA DESFEROXAMINA

Tània García Soldevila

ISBN:978-84-694-1243-5/DL:T-319-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT PROOXIDANT DE L'ALUMINI EN L'ACTOLINS TG2576. PAPER PROTECTOR DE LA MELATONINA
I DE LA DESFEROXAMINA

Tània García Soldevila

ISBN:978-84-694-1243-5/DL:T-319-2011



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

María Mercedes Gómez Arnaiz, Catedràtica d'Escola Universitària de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira Virgili i José Luís Domingo Roig, Catedràtic de Toxicologia de la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira Virgili.

CERTIFIQUEN QUE:

La Tesi Doctoral titulada: "Avaluació de l'activitat prooxidant de l'alumini en ratolins Tg2576. Paper protector de la melatonina i de la desferoxamina" presentada per Tania Garcia Soldevila, ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix els requisits per a optar al títol de Doctor.

I perquè se'n prengui coneixement i tingui els efectes que correspongui, signem aquesta certificació.

Reus, 22/09/2010

Dra. María Mercedes Gómez Arnaiz

Dr. José Luís Domingo Roig

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT PROOXIDANT DE L'ALUMINI EN L'ACTOLINS TG2576. PAPER PROTECTOR DE LA MELATONINA
I DE LA DESFEROXAMINA

Tània García Soldevila

ISBN:978-84-694-1243-5/DL:T-319-2011

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

23

1. ALUMINI	25
1.1. CONCEPTES GENERALS.....	25
1.2. PROPIETATS FÍSiques I QUÍMIQUES.....	28
1.3. FONTS D'EXPOSICIÓ.....	29
1.3.1. Nivells ambientals.....	30
1.3.1.1. Aire.....	30
1.3.1.2. Aigua.....	30
1.3.1.3. Sòls i sediments.....	31
1.3.2. Exposició ocupacional.....	31
1.3.3. Exposició a través de la dieta.....	32
1.4. TOXICOCINÈTICA DE L'ALUMINI.....	34
1.4.1. Absorció.....	34
1.4.2. Distribució.....	35
1.4.3. Metabolisme.....	36
1.4.4. Excreció.....	37
1.5. TOXICITAT DE L'ALUMINI.....	37
2. NEUROTOXICITAT DE L'ALUMINI	40
2.1. NEUROTOXICITAT DE L'ALUMINI.....	40
2.1.1. L'alumini al sistema nerviós central	
2.1.1.1. Entrada de l'alumini al cervell.....	41
2.1.1.2. Efectes de l'alumini al sistema nerviós central.....	42
2.2. EFECTES PROOXIDANTS DE L'ALUMINI.....	45
2.2.1. Conceptes generals.....	45
2.2.2. Alumini i estrès oxidatiu.....	46
2.2.2.1. L'alumini estimula la capacitat oxidant del O_2^-	47
2.2.2.2. L'alumini facilita l'oxidació de les membranes.....	47

2.2.2.3.	L'alumini altera l'activitat dels enzims antioxidants.....	49
2.3.	ALUMINI I MALALTIA D'ALZHEIMER.....	52
2.3.1.	Malaltia d'Alzheimer.....	52
2.3.2.	Metalls i Alzheimer.....	54
2.3.3.	Alumini i Alzheimer.....	57
3.	MELATONINA I DESFEROXAMINA	62
3.1.	MELATONINA I DESFEROXAMINA COM A POSSIBLES PROTECTORS.....	62
3.2.	MELATONINA.....	62
3.2.1.	Efectes antioxidants de la melatonina.....	64
3.2.2.	Efectes protectors de la melatonina davant de la toxicitat de l'alumini.....	65
3.3.	DESFEROXAMINA (DFO).....	66
HIPÒTESI I OBJECTIUS		69
1. HIPÒTESI		71
2. OBJECTIUS		72
2.1.	OBJECTIU GENERAL.....	72
2.2.	OBJECTIUS ESPECÍFICS.....	72
MATERIAL I MÈTODES		73
1. MATERIAL I REACTIUS		75
1.1.	MODEL ANIMAL PER A L'ESTUDI DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER: RATOLINS Tg2576.....	75
1.2.	ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ.....	76
1.3.	REACTIUS.....	76
1.4.	MATERIAL.....	79

1.4.1.	Aparells per a la realització de les proves cognitives i conductuals.....	79
1.4.2.	Altres materials i instruments de laboratori.....	80
2.	METODOLOGIA	82
2.1.	GRUPS DE TRACTAMENT.....	82
2.2.	PREPARACIÓ I ADMINISTRACIÓ DEL TRACTAMENT.....	82
2.3.	TESTS D'APRENTATGE.....	83
2.4.	SACRIFICI DELS ANIMALS I RECOLLIDA DE MOSTRES.....	84
2.5.	AVALUACIÓ DE LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA I DELS SISTEMES ANTIOXIDANTS.....	85
2.5.1.	Avaluació de la peroxidació lipídica.....	85
2.5.2.	Determinació del glutatió.....	86
2.5.3.	Determinació dels antioxidants enzimàtics.....	87
2.5.4.	Determinació de la concentració de proteïnes totals.....	90
2.6.	AVALUACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE L'mRNA DELS ENZIMS ANTIOXIDANTS.....	91
2.6.1.	Extracció de l'RNA.....	91
2.6.2.	Transcripció inversa.....	91
2.6.3.	Real Time PCR.....	91
2.7.	DETERMINACIÓ DELS NIVELLS D'ALUMINI EN EL TEIXIT CEREBRAL.....	93
	RESULTATS	95
	RESULTATS PUBLICATS	97
1.	Aluminum exposure through the diet: Metal levels in AβPP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease.....	99
2.	Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum.....	107

3. Protective role of melatonin on oxidative stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of AβPP transgenic mice after chronic exposure to aluminum.....	117
4. Role of deferoxamine on enzymatic stress markers in an animal model of Alzheimer's disease after chronic aluminum exposure.....	133
5. Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioural effects of Aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease.....	149
RESULTATS NO PUBLICATS.....	159
6. Efectes conductuals i cognitius de l'exposició a DFO.....	161
Discussió	169
Conclusions generals	191
Bibliografia	195

ABREVIACIONS

ACSA: Agència Catalana de Seguretat Alimentària

APP: Proteïna Precursora d'Amiloide

ATSDR: Agència per al Registre de Substàncies Tòxiques i Malalties (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)

BHE: Barrera Hematoencefàlica

DFO: Desferoxamina

EFSA: Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (European Food Safety Authority)

ELA: Esclerosi Lateral Amiotròfica

EPA: Agència de Protecció Ambiental (Environmental Protection Agency)

FDA: Agència Americana d'Alimentació i Drogues (Food and Drug Administration)

IARC: Agència Internacional de Recerca contra el Càncer

IRC: Insuficiència Renal Crònica

IST: Ingesta Setmanal Tolerable

LOAEL: Nivell més baix en què s'observen efectes adversos (Lowest-Observed-Adverse-Effect Level)

MA: Malaltia d'Alzheimer

MRL: Estimació de l'exposició humana diària a un compost químic que probablement no representa un gran risc d'efectes adversos

NFT: Cabdells Neurofibril·lars

NF-kB: Factor de Transcripció kB

NOAEL: Nivell en què no s'observen efectes adversos (No-Observed-Adverse-Effect Level)

OMS: Organització Mundial de la Salut

OSHA: Administració de Salut i Seguretat Ocupacional (Occupational Safety and Health Administration)

PM₁₀: Partícules Toràciques Totals

PM_{2,5}: Partícules Respirables

PS: Plaques Senils

RfDo: Dosi de Referència Oral

ROS: Radicals d'Oxigen

SCN: Nucli Supraquiasmàtic

TNF- α : Factor de necrosi tumoral

WHO: Organització Mundial de la Salut (World Health Organization)

INTRODUCCIÓ

1. ALUMINI

1.1. CONCEPTES GENERALS

El nom d'*alumini* prové d'*alum* ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), compost inorgànic que s'usava a l'antiga Grècia i a Roma de forma medicinal com a astringent. Tot i així, en aquella època encara no es coneixia l'alumini com a metall, i no va ser fins al 1821 que Pierre Berthier, un geòleg francès, va descobrir a la localitat de Les Baux la bauxita, la principal font d'alumini utilitzada en l'època moderna.

L'alumini va ser descobert a principis del segle XIX per Hansa Christian Oersted, i el químic alemany Fredrich Wöhler. Va ser el 1825 quan Oersted va aïllar una mostra d'alumini impur en fer reaccionar clorur d'alumini ($AlCl_3$) amb un aliatge de potassi i mercuri. En escalfar l'amalgama resultant sota baixa pressió es produí l'ebullició del mercuri i el depòsit d'alumini. Posteriorment, Wöhler va millorar la tècnica usada per Oersted i aconseguí aïllar per primera vegada partícules d'alumini pur el 1845, i també en mesurà les principals propietats físiques i químiques, com la densitat, la conductivitat, la resistència a la corrosió, etc. (Greenwood i Earnshaw, 1997). El 1886, quan Charles Hall i Paul Héroult van obtenir la patent per al descobriment de l'obtenció d'alumini mitjançant electròlisi (procés Hall-Héroult), es va començar a fabricar alumini en quantitats industrials i en va disminuir el preu. Actualment, i gràcies a aquests dos científics, l'alumini és un metall d'ús quotidià i molt econòmic de produir.

L'alumini és el tercer element més abundant en l'escorça terrestre (8%) per darrere del silici i l'oxigen. Tot i que és un metall molt ubic, no és un metall essencial i no té cap funció biològica coneguda. Tot i així, per la seva àmplia distribució en el medi ambient, els humans ens hi podem trobar molt freqüentment exposats.

L'alumini s'allibera al medi per processos naturals d'erosió dels sòls i a partir de les erupcions volcàniques, així com a partir de l'activitat humana (mineria, producció de metall, etc.). A la natura es troba sempre de forma combinada amb altres elements, generalment en forma de silicats d'alumini, òxids i hidròxids, juntament amb altres elements com ara el sodi i el fluor, així com formant complexos amb la matèria orgànica. Aquests compostos d'alumini, els trobem formant part dels sòls, d'alguns minerals (la caolinita $[Al_2(OH)_4Si_2O_5]$, la vermiculita, la criolita (Na_3AlF_6), l'espinel·la

($MgAl_2O_4$), el granat [$Ca_3Al_2(SiO_4)_3$], el beril ($Be_3Al_2Si_6O_{18}$) i la turquesa [$Al_2(OH)_3PO_4H_2O/Cu$], a l'argila i a algunes roques. Tanmateix, moltes gemmes precioses són formes impures de l' Al_2O_3 (robí, safir, maragda, etc.) (Greenwood i Earnshaw, 1997).

La font més important d'alumini metàl·lic és la bauxita, produïda per la meteorització de les roques ígnies en condicions geomorfològiques favorables i que conté un 55% d'òxid d'alumini (Al_2O_3). A partir del procés de refinament de la bauxita, s'obté l'alúmina (Al_2O_3), que mitjançant processos de reducció electrolítica dona lloc a l'alumini metàl·lic. L'any 2006, el 90% de la bauxita usada als Estats Units era destinada a la producció d'alumini (Jones i Bennet, 1986; OMS, 1998; ATSDR 2008).

Avui dia, existeixen més de 300 fàbriques d'alumini arreu del món. La producció mundial d'alumini ha passat de 14,8 milions de tones l'any 1992 a 29,2 milions de tones l'any 2004. Es produeix a 41 països diferents i la Xina n'és el primer productor amb un 22% de la producció mundial, seguit per Rússia (12%), el Canadà (9%), els Estats Units (8,5%), Austràlia (3,8%), el Brasil (5%) i Noruega (4,5%). L'any 2006 l'alumini es produïa a 42 països amb una producció de 69,2 milions de tones. Si també es té en compte l'alumini reciclat, el percentatge pujava a 41 milions de tones l'any 2004.

Els compostos d'alumini tenen una gran varietat d'aplicacions industrials, sobretot en enginyeria elèctrica, transport i a les indústries de la construcció. També s'usa alumini en les indústries de paper, en la fabricació d'explosius i com a component de certs pesticides. També s'utilitza per a la fabricació d'utensilis de casa, electrodomèstics i materials d'emalatge. El sulfat d'alumini ($Al_2(SO_4)_3$) s'empra per al tractament de l'aigua potable, per millorar-ne la claredat. Tanmateix, diversos compostos d'alumini s'usen per al processament, embalatge i conservació dels aliments, així com per a la preparació d'additius alimentaris. Dins la indústria farmacèutica també s'utilitza l'alumini com a antitranspirant i desodorant, productes cosmètics i diversos fàrmacs. (ASTDR, 1999; Soni i col·l., 2001).

En general, els nivells d'alumini en el medi ambient varien segons la localització i la zona on s'agafen les mostres que s'analitzen. Així com, la mobilització del metall pel medi depèn de factors com el pH, la salinitat i la presència d'espècies amb les quals

pugui formar complexos. L'acidificació ambiental pot mobilitzar l'alumini des de terra fins al medi aquàtic.

Els nivells d'alumini a l'atmosfera són en general baixos, amb uns nivells de 0,005 a 0,18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a les zones rurals. En zones urbanes aquests nivells augmenten. A l'aigua terrestre, els nivells del metall són molt baixos, amb uns nivells del valor de $<0,1 \text{ mg}/\text{L}$, i augmenten en aigües més àcides. Els seus nivells en sòls varien, amb valors que van de 7 a 100 g/kg (ASTDR 2008).

S'ha comprovat que l'exposició a l'alumini pot provocar efectes adversos en humans, de forma que s'ha considerat un compost tòxic i neurotòxic. L'alumini s'ha relacionat amb diverses malalties com l'encefalopatia induïda per diàlisi (degut a que les sals d'alumini utilitzades en l'aigua de diàlisi per retirar, per precipitació, l'excés de fosfat dels pacients motiva un excés d'incorporació d'alumini a l'organisme), l'anèmia microcítica i l'osteomalàcia. I també amb diverses malalties neurodegeneratives com l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA), el Parkinson i la malaltia d'Alzheimer (MA).

Tot i que l'exposició a baixes dosis d'alumini (ja sigui a través de la ingestió d'aliments, d'aigua, o mitjançant contacte dèrmic) no causaria danys a la salut, l'alumini a dosis altes podria causar efectes tòxics i neurotòxics. La majoria d'efectes tòxics per exposició a alumini en humans s'han documentat en infants prematurs. Això és degut a l'alimentació parenteral que se'ls administra. També s'observa en pacients amb disfuncions renals, ja que tenen dificultats per excretar l'alumini absorbit. Tot i així, també s'han observat casos en la resta de la població, així com en treballadors que han entrat en contacte amb el metall per exposició ocupacional. Tanmateix, l'autèntic problema davant l'exposició a alumini recau en aquelles persones que per causes de salut, no podrien excretar correctament l'alumini absorbit i, per tant, l'acumulació d'alumini podria donar lloc a efectes tòxics.

Hem de tenir en compte que l'aparició d'efectes tòxics per exposició a l'alumini dependrà de la solubilitat i la biohabilitat dels compostos d'alumini administrats, així com de la dosi, la durada i la ruta d'exposició.

1.2. PROPIETATS FÍSQUES I QUÍMIQUES

L'alumini és un metall de color blanc platejat, sòlid a temperatura ambient, de símbol Al, número atòmic 13 i un pes atòmic de 26,9815 g/mol que pertany al grup IIIA de la taula periòdica. Té dos estats de valència: 3+ i 0, tot i que aquesta última no es troba en el medi natural al ser un metall molt reactiu. Com que no té electrons desaparellats en els orbitals *d* i *f* (la seva configuració electrònica és $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^1$), no és un metall de transició i per tant té un comportament químic (propietats redox) diferent a altres metalls com ara el ferro. D'altra banda, com a element del grup 13, l'alumini té una gran reactivitat química a temperatures moderades i en solucions aquoses.

L'alumini pot combinar-se amb la majoria d'elements no metàl·lics de la taula periòdica, formant compostos com AlN, Al₂S₃, AlX₃, etc. Té una gran afinitat amb l'oxigen i també és capaç de formar compostos intermetàl·lics (Greenwood i Earnshaw, 1997; ASTDR, 2008).

L'alumini és un ió de mida petita (àcid de Lewis), amb una gran densitat de càrrega, que es coordina amb bases de Lewis petites com ara OH⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, COO⁻, ROH, RO⁻. Els enllaços químics que forma l'alumini són de tipus electrostàtic, i per tant, la seva càrrega i la seva mida són molt importants. El seu radi iònic és semblant al d'altres ions, com el Fe³⁺ i el Mg²⁺, i per tant podrà competir amb ells i intervenir en les seves rutes metabòliques, donant lloc a efectes adversos (Yokel, 2004).

Les diferents espècies químiques que pot presentar l'alumini són importants per a la seva toxicocinètica i la seva solubilitat. A la natura, el podem trobar formant part de solucions aquoses. L'ió Al (III) és un ió molt solvent, capaç de formar complexos amb les molècules d'aigua, que s'hidrolitza amb facilitat i que a pHs neutres forma hidròxids (OH⁻) insolubles i en solucions àcides forma complexos solubles amb diversos lligants inorgànics com F⁻, HCO₃⁻, SO₄²⁻, PO₃³⁻. L'ió aquós Al(III) és l'ió trivalent més fort que es troba a la natura i en els sistemes biològics. En solucions àcides (pH<5), l'alumini es troba en estat Al³⁺ (Al(H₂O)₆³⁺), i a mesura que augmenta el seu pH disminueix la seva solubilitat, precipitant en forma d'hidròxid d'alumini (Al(OH)₃) en la seva forma neutra i d'altres espècies: Al(OH)²⁺, Al(OH)₂⁺, Al(OH)₄⁻ (Yokel, 2004). Per tant, s'entén que el pH del medi determinarà la solubilitat o la insolubilitat de l'alumini i de les diferents espècies iòniques predominants.

Les propietats físiques més importants de l'alumini són: lleugeresa (la densitat del sòlid és de $2.700 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$), una bona resistència a la corrosió, mal-leabilitat, ductilitat, gran conductivitat tèrmica ($235 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$) i baixa resistència elèctrica ($2.65 \text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$) i sense propietats magnètiques. Així mateix, l'alumini és un material fàcil i barat de reciclar.

Per aquestes propietats, l'alumini té un paper molt important dins la indústria i dins l'àmbit comercial.

1.3. FONTS D'EXPOSICIÓ

L'alumini s'allibera i es dispersa pel medi, tan a través de processos naturals com a partir de l'activitat humana. Per la naturalesa ubiqua de l'alumini, ens podem trobar exposats a aquest metall per contacte dèrmic, oral i a través de l'aire (l'exposició a l'alumini es pot donar per respiració de les seves partícules suspeses a l'aire en zones de treball en què l'alumini és processat, o bé en zones que presenten nivells alts d'alumini de forma natural).

De totes les possibles vies d'exposició, deixant de banda l'exposició ocupacional i l'ús de certs medicaments, com els antiàcids, la ingestió d'aliments i d'aigua serien la principal font d'exposició al metall.

Els ciutadans que viuen en zones properes a les indústries on s'usa o es processa l'alumini, les persones amb problemes renals que necessiten tractaments llargs de diàlisi, infants prematurs i individus que consumeixen antiàcids i fàrmacs antidiarreics i per a les úlceres gàstriques, serien els individus que es trobarien exposats als majors nivells d'alumini.

Tot i que l'alumini no ha estat classificat com a carcinogen, l'Agència Internacional de Recerca sobre el Càncer (IARC, 1984) sí que ha classificat com a carcinògena a la producció d'alumini, de forma que s'han establert límits d'exposició ocupacionals i per a la ingesta d'aigua i aliments.

1.3.1. Nivells ambientals

1.3.1.1. Aire

L'alumini entra en contacte amb l'atmosfera en forma de partícules de pols per l'erosió dels sòls, per les activitats mineres i agrícoles, per les erupcions volcàniques i per la combustió del carbó.

Els nivells d'alumini a l'atmosfera varien molt depenent de la zona de mostreig, les condicions meteorològiques i el nivell d'activitat industrial i de trànsit a la zona. Els nivells d'alumini a l'aire acostumen a tenir valors d'entre 0,005 i 0,18 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. En zones urbanes i industrials, aquests nivells arriben a valors d'entre 0,4 i 8,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (ASTDR, 2008).

És important conèixer la mida de les partícules d'alumini de la pols de l'aire, ja que la seva disposició en el sistema respiratori i, per tant, la importància dels seus efectes tòxics en depenen. És per això que els valors del límit d'exposició es defineixen per una determinada fracció de mida de les partícules.

S'anomenen PM_{10} (partícules toràciques totals) les partícules petites de $d_{ae}=2.5-10 \mu\text{m}$ que, per la seva mida reduïda, poden penetrar en el sistema respiratori i causar efectes adversos, i $\text{PM}_{2.5}$ (partícules respirables) aquelles partícules que, en ser més petites i estar formades per compostos més tòxics, poden afectar de forma més greu la salut. L'agència de protecció ambiental EPA (Environmental Protection Agency) ha trobat uns nivells per l'alumini de PM_{10} d'entre 0,58-6,97 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ i de 0,035-1,82 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ per a $\text{PM}_{2.5}$ que s'han relacionat amb efectes adversos sobre la salut (EPA, 2005).

1.3.1.2. Aigua

La presència d'alumini als medis aquàtics és deguda a l'erosió de roques i minerals, així com a la mobilització del metall des dels sòls fins a l'aigua a partir de l'acidificació ambiental. Tot i així, els nivells d'alumini a l'aigua es poden trobar augmentats degut a l'activitat humana.

Els nivells d'alumini a l'aigua depenen del seu pH. L'alumini és poc soluble en aigua a un pH de 6 a 8. Només es troben concentracions altes d'alumini en medis amb un pH

de 5. Per tant, com que el pH de la majoria de medis aquàtics és de 6 a 9, la concentració del metall a la majoria de medis aquàtics és baix. En general, els nivells d'alumini a pH > 5,5 són de <0,1 mg/L (ASTDR, 2008).

1.3.1.3. Sòls i sediments

La concentració d'alumini s'estima en uns valors de 9.000-94.000 µg/g en sediments i de 700-300.000 µg/g en sòls.

Els sòls són una font d'espècies solubles d'alumini per al medi aquàtic. Per tant, sòls i sediments són determinants en els nivells i formes d'alumini en aigua (ASTDR, 2008; Krewski i col·l., 2007).

1.3.2. Exposició ocupacional

La principal exposició dels treballadors al metall es dona durant la producció d'alumini. Els treballadors de les refineries d'alumini es poden veure exposats a hidròxid d'alumini a través del procés de Bayer (principal mètode industrial per produir alumina a partir de la bauxita) i a través de les partícules d'aire de composició variada. Tot i així, l'exposició ocupacional no es limita a les refineries d'alumini, sinó també a les indústries que utilitzen productes d'alumini.

S'ha examinat l'efecte de l'exposició a compostos d'alumini en treballadors de diferents àrees de la indústria de producció primària d'alumini, com són les mines de bauxita i les refineries d'alumini, així com en individus de poblacions exposades ocupacionalment al metall. Molts estudis han documentat efectes adversos en el tracte respiratori de treballadors industrials. S'han observat síndromes semblants a l'asma, dificultat de respiració i alteracions de la funcionalitat pulmonar.

Tanmateix, els nivells d'alumini trobats en els individus de poblacions exposades ocupacionalment al metall a través de les partícules suspeses a l'aire són de 6×10^{-3} mg/kg bw/dia, comparats amb els $1,7 \times 10^{-5}$ mg/kg bw/dia d'individus de poblacions generals (Krewski i col·l., 2007).

1.3.3. Exposició a través de la dieta

L'alumini a què ens trobem exposats a través de la dieta prové en part dels conservants, colorants, llevats i additius en general que s'usen en els aliments comercials. També ens trobem exposats a l'alumini degut a l'aigua utilitzada per preparar els aliments, i fins i tot a través dels nivells d'alumini que contenen vegetals i fruites de forma natural. La concentració d'alumini en aquests últims dependrà de les condicions dels sòls, a excepció de certes herbes i del te, dels quals coneixem els seus nivells (5 µg/g de te) (Madhusudan i col·l., 2001).

La majoria d'aliments no elaborats no contenen nivells alts d'alumini (< 5 mg/kg). Les majors concentracions del metall (> 5 mg/kg) es troben al pa i productes farinacis, alguns vegetals (bolets, espinacs, bleda, rave, enciam i blat de moro dolç), en vísceres, marisc i, sobretot, en espècies, te i tisanes (ACSA, 2010).

Taula 1. Concentracions estimades d'alumini per alguns aliments

aliment	(mg Al/ 100g)	aliment	(mg Al/ 100g)
Productes animals		Grans	
formatge natural	1.57	pa blanc	0.30
formatge processat	29.70	pa integral	0.54
hamburguesa	2.00	muffins	12.80
llet	0.07	pancake	6.90
Fruïtes		Vegetals	
Poma	0.01	espinacs bullides	2.50
Plàtan	0.04	mongetes verdes	0.34
		patata cuinada	1.08
Herbes i espècies			
pebre negre	14.30		
te (de bossa,sec)	128.00		
orenga	60.00		

Adaptat de Madhusudan., *Regul Toxicol Pharmacol*, 2001

La concentració de metall que trobem a l'aigua potable depèn del lloc de procedència de l'aigua, així com dels coagulants d'alumini usats durant el seu tractament. En els processos de purificació i tractament de l'aigua, s'usen sals d'alumini com a coagulants per tractar-ne el color i la torbesa. El consum d'alumini a través de l'aigua és el 3% de l'alumini ingerit diàriament, i l'EPA ha limitat els nivells d'alumini permesos per a l'aigua embotellada en 0,2 mg/L (ASTDR, 2008).

L'alumini també es troba contaminant molts dels materials usats per preparar solucions que es troben a l'alimentació parenteral. És per aquest motiu que la FDA americana (Food and Drug Administration) ha passat a limitar la concentració d'alumini en aquestes solucions a 5 µg/kg/dia (Klein, 2005).

La ingesta d'alumini d'un adult estàndard als Estats Units es troba a uns nivells de 7-9 mg al dia (ASTDR, 2008). Pennington i Shoen (1995) van calcular la ingesta diària d'alumini i van obtenir uns valors de 0,7 mg/dia en infants de 6 i 11 mesos d'edat, 11,5 mg/dia en nois de 14-16 anys i uns valors de 8-9 i 7 mg/dia en homes i dones adults respectivament (Madhusudan i col·l., 2001).

D'acord amb l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA), l'exposició estimada de la població europea se situa entre 0,2 i 1,5 mg/kg de pes corporal per setmana per a un europeu adult, i pot arribar a 2,3 mg/kg de pes corporal setmanal en consumidors altament exposats (EFSA, 2008; ACSA, 2010).

Tot i que la ingesta a través dels aliments s'ha considerat major que a través del consum d'aigua, molts estudis mostren que és a l'aigua on l'alumini es troba en la seva forma més biodisponible i amb major facilitat per ser absorbit (Forster i col·l., 1995; Martyn i col·l., 1997; Exley i Esiri, 2006; Yokel i Florence, 2006). Tanmateix, actualment existeix literatura que observa el contrari (Yokel i col·l., 2008).

1.4. TOXICOCINÈTICA DE L'ALUMINI

1.4.1. Absorció

En humans, l'alumini s'absorbeix a través, (1) de la dieta (també aigua i medicaments) mitjançant el tracte gastrointestinal, (2) per inhalació de les partícules d'alumini a través de l'epiteli olfatiu, (3) per inhalació de les partícules d'alumini a través de la boca, mitjançant el tracte gastrointestinal i (4) a través de la pell per contacte dèrmic.

La viabilitat de l'alumini depèn del compost d'alumini al qual ens trobem exposats, però també de la presència de diferents components en la dieta que poden formar complexos amb el metall, com són els àcids orgànics, el fòsfor o el silici, que en faciliten o n'inhibeixen l'absorció.

Els mecanismes proposats per explicar com es a du a terme l'absorció de l'alumini a través del tracte gastrointestinal han estat: el transport per difusió passiva i activa a través de les cèl·lules intestinals i per difusió paracel·lular entre aquestes cèl·lules. Un cop a la circulació sanguínia, l'alumini pot unir-se a diferents lligants i acumular-se en diferents òrgans, majoritàriament als ossos i els pulmons.

L'absorció de l'alumini a través del tracte gastrointestinal és del 0,1% i augmenta a un pH àcid o bé si l'alumini és administrat junt amb àcids carboxílics (COOH) en forma de citrat o lactat. L'àcid cítric (C₆H₈O₇) es troba present en molts aliments i begudes i és l'àcid que millor facilita l'absorció del metall. Es creu que el citrat intensifica l'absorció del metall per un mecanisme que augmenta la permeabilitat cel·lular a nivell de les unions intercel·lulars (Winklhofer i col·l., 2000).

L'absorció gastrointestinal és baixa perquè les sals d'alumini es transformen en ortofosfat d'alumini (AlPO₄) en el tracte digestiu, i aquest compost és insoluble. (Venugopal i Luckey, 1978). A pH gàstric, l'alumini ingerit és ionitzat com a Al³⁺, degut al suc gàstric de l'estómac i al seu pH, que a la vegada es troben influenciats per altres factors fisiològics, factors físics i químics (ex. presència a l'estómac d'aliments rics en greixos) i factors endocrins (secreció gàstrica) (Madhusan i col·l., 2001).

L'absorció per via inhalatòria s'estima en el 2%. L'absorció de l'alumini a través de l'aire es produeix a través dels pulmons, del tracte gastrointestinal i de la via olfactiva, de forma intranasal. Certs estudis han mostrat que l'alumini pot penetrar al cervell directament a través del tracte olfactiv (Zatta i col·l., 1993; ASTDR, 2008).

L'absorció a través de la pell ha estat menys estudiada. Tot i així, en un estudi amb clorhidrat d'alumini, ^{26}Al (molts estudis han usat ^{26}Al per estudiar el metabolisme del metall), un component dels antitranspirants, es va observar com després de l'aplicació dèrmica d'aquest compost en humans s'obtenia una excreció del 0.012% del ^{26}Al a través de l'orina durant els següents 53 dies a l'aplicació (Flarend i col·l., 2001).

L'alumini, un cop absorbit, pot formar complexos amb diverses molècules, com ara àcids orgànics, aminoàcids, nucleòtids, etc., i produir efectes adversos per als humans. Hem de pensar, que dins d'un estat de salut favorable, el cos té barreres efectives, com ara el tracte gastrointestinal, per reduir l'absorció d'alumini. De totes maneres, el poc alumini que s'absorbeix s'excreta a través de l'orina i la femta. Tot i així, l'alumini que penetra a l'organisme pot persistir molt de temps, fins i tot anys, en els teixits abans d'excretar-se.

1.4.2. Distribució

La ruta i el mecanisme en què l'alumini és absorbit, té una gran influència sobre la distribució sistèmica del metall. Un cop absorbit, l'alumini passa a la circulació sanguínia, on és transportat unit a la transferrina o el citrat als diferents teixits diana. La distribució de l'alumini en els diferents òrgans i teixits també dependrà de la dosi rebuda, la duració de l'exposició i la via d'administració.

Els ossos són un dels principals teixits diana on s'acumula l'alumini. L'alumini s'acumularia aproximadament en un 60% als ossos, un 25% als pulmons, un 10% als músculs, un 3% al fetge i un 1% al cervell quan travessa la barrera hematoencefàlica (BHE) (Krewski i col·l., 2007). Tanmateix, també es pot acumular als ronyons i en altres teixits.

L'acumulació d'alumini es troba negativament correlacionada amb la presència de ferro dins l'organisme. Això es deu a la competició que es crea entre els dos ions, en tenir el radi iònic semblant, de forma que l'alumini s'uneix a la transferrina i la ferritina i

facilita la seva distribució a baixes concentracions de ferro (Greger i Sutherland, 1997). Està documentat que més del 90% de l'alumini del plasma es troba unit a la transferrina, mentre que el restant es troba majoritàriament associat a citrat (Ohman i Martin, 1994; Verstaeten i col·l., 2008).

Per la quantitat de biomolècules a les quals l'alumini és capaç d'unir-se, i per la seva capacitat de competir amb altres cations, com el Fe^{2+} , el Mg^{2+} i el Ca^{2+} pels seus llocs d'unió, moltes rutes metabòliques són una potent diana davant la toxicitat de l'alumini. L'alumini és capaç de travessar la BHE i acumular-se a les neurones i les cèl·lules glials. Tot i que aquest teixit conté un mecanisme d'aflux per al metall (transportadors monocarboxilats), a altes concentracions d'alumini en sang, aquest sistema es trobaria desbordat i l'alumini acabaria acumulant-se al teixit cerebral (Verstaeten i col·l., 2008).

La distribució i disposició de l'alumini a partir de l'exposició per inhalació es du a terme a través dels pulmons, tenint en compte la mida de les partícules inhalades. Algunes d'aquestes partícules són respirables, altres queden dipositades al tracte gastrointestinal a través de la mucosa, i la resta queden atrapades als alvèols pulmonars, per on poden passar a la circulació sanguínia.

1.4.3. Metabolisme

El metabolisme dels metalls inclou la forma en que s'emmagatzemen, el tractament un cop a completat la seva funció, i la preparació del metall per ser excretat.

L'alumini s'acumula a la majoria de les cèl·lules de l'organisme. Quan moren aquestes, la càrrega d'alumini es redistribueix i una porció s'excreta unida als lisosomes.

En els organismes vius, l'alumini es creu que es troba en formes diferents: com a ió lliure, formant complexos de baix pes molecular i unit a diferents macromolècules. L'alumini pot formar complexos de baix pes molecular com aminoàcids, nucleòtids, carbohidrats, etc. Aquests complexos són metabòlicament actius, en particular els no polars. Tanmateix, l'alumini té una gran afinitat per les proteïnes i els glicosaminoglicans, i per tan, gran part del metall en el cos existeix vinculat a complexos macromoleculars. Aquests complexos són metabòlicament menys actius que els complexos de baix pes molecular (ASTDR, 2008).

1.4.4. Excreció

La principal via d'excreció de l'alumini absorbit són els ronyons, i, segons s'ha proposat, seria excretat a través de la nefrona distal. L'excreció de l'alumini a través de l'orina és la principal via d'eliminació després d'una exposició oral o per inhalació, i en menor quantitat a través de la bilis. D'altra banda, l'alumini que no ha estat absorbit és eliminat principalment a través de les femtes (Krewski i col·l., 2007).

Els nivells d'alumini en l'orina són un bon índex per avaluar una exposició recent al metall, tot i que no serveixen per determinar l'acumulació d'alumini en els diferents teixits.

1.5. TOXICITAT DE L'ALUMINI

Tot i que al principi l'alumini es considerava innocu (Sorenson i col·l. 1974), amb els anys s'ha vist que és un potent tòxic i neurotòxic. Com que, en solució, les sals d'alumini formen espècies hidroxil capaces de formar partícules col·loïdals i polimèriques que són insolubles, es va assumir que l'absorció d'alumini seria limitada i que, per tant, seria un metall força innocu. Tot i així, s'ha vist que l'acumulació d'alumini pot produir efectes adversos en plantes, animals i humans (Campbell, 2006).

L'alumini pot inhibir el creixement de plantes i arbres, reduir la supervivència i alterar la reproducció de peixos i amfibis, i s'han estudiat molts compostos d'alumini que han estat considerats perillosos i amb efectes tòxics per als organismes aquàtics. Així mateix, en humans s'ha observat que l'alumini pot penetrar al torrent sanguini i afectar teixits i òrgans (Yokel, 2000; Yokel 2004).

La presència d'alumini suposa un greu problema en l'agricultura. A les terres de conreu àcides amb pH inferiors a 5, l'alumini es solubilitza i pot provocar la inhibició del creixement de les arrels i la incorporació massiva del metall a la planta, sent absorbit pels vegetals que el poden incorporar a les seves estructures cel·lulars. En les terres de cultiu dels països dels tròpics i en vies de desenvolupament on es donen aquestes condicions, comporten una limitació en el creixement de les plantacions.

S'ha relacionat l'exposició a alumini amb un major risc de patir certes patologies, com l'osteomalàcia i l'anèmia microcítica. Woodson, el 1998, va avaluar dones de 39 anys d'edat que havien estat consumint uns 70 g/dia d'antiàcid comercial durant 8 anys. Aquestes pacients van desenvolupar una osteomalàcia greu per l'esgotament de fosfat (PO_4^{2-}) degut a que l'alumini és capaç d'unir-se amb el fòsfor provinent de la dieta i impedir així la seva absorció a través del tracte gastrointestinal (Woodson, 1998). Aquest mateix resultat es va trobar en un segon estudi, en el qual, dones de 75 anys d'edat també s'havien trobat exposades a alumini mitjançant el consum d'antiàcids (Kassem i col·l., 1991). En tots dos casos, els efectes van millorar en suprimir el consum del medicament i ser tractades amb vitamina D, calci i PO_4^{2-} . També s'han trobat casos d'osteomalàcia en pacients amb problemes renals en tractament amb diàlisi.

S'han documentat diferents casos de toxicitat per exposició ocupacional en individus que treballen a la indústria de l'alumini, i s'han observat diversos efectes adversos en el tracte respiratori. Les primeres dades referents als efectes tòxics per exposició ocupacional a l'alumini foren descrites el 1947, quan Shaver i Ridell van observar 23 casos de malalties pulmonars en 344 treballadors de la producció d'alumini. El 1997, San i col·l. van realitzar un estudi en treballadors exposats a partícules d'alumini a través de l'aire per investigar com es veia afectada la funció pulmonar i si existia un efecte dosi-resposta. Els resultats de l'estudi, que comprenia 55 treballadors i 30 controls, mostraren que els nivells d'alumini en sèrum dels treballadors eren significativament majors que els dels controls, així com, es va observar que els desordres respiratoris trobats estaven relacionats amb la duració de l'exposició a la pols d'alumini. En l'actualitat, diferents estudis han mostrat efectes adversos a l'exposició ocupacional a l'alumini (Höflich i col·l., 2005; Björ i col·l., 2008; Siruin i col·l., 2008; Bogdanović i Bulat, 2008).

D'altra banda, també s'han estudiat els efectes neurotòxics de l'alumini. Diversos estudis científics han mostrat que l'alumini és capaç de produir alteracions del sistema motor i cognitiu, així com s'ha relacionat l'alumini amb diverses malalties neurodegeneratives com són l'ELA, la Demència parkinsoniana i la MA (Kawahara, 2005).

Tan sols trobem unes poques normes reguladores o pautes internacionals respecte a l'alumini. L'ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) ha presentat

uns Nivells de Risc Mínims (MRL) per a una exposició oral i no crònica (de 15 a 364 dies) d'1 mg/kg/dia per l'alumini. L'MRL es defineix com un estimat de l'exposició humana diària a un compost químic que probablement no representi un gran risc d'efectes adversos durant un període d'exposició específic. L'MRL calculat es basa en uns valors per a l'alumini de NOAEL de 26 mg/kg/dia, i de 130 mg/kg/dia per al LOAEL. NOAEL i LOAEL representen, respectivament, el nivells màxims provats als quals no s'observen efectes tòxics i els nivells més baixos a partir dels quals ja observem efectes adversos. Els valors de LOAEL s'han tret a partir dels nivells d'alumini que produïen toxicitat del desenvolupament en cries de ratolí exposades a lactat d'alumini durant la gestació i fins la lactància. Per a una exposició crònica (> 365 dies), els valors donats per l'alumini han estat d'1 mg/kg/dia i 100 mg/kg/dia per al MRL i el LOAEL respectivament (ASTDR, 2008).

Un cop definits el NOAEL i el LOAEL, es pot estimar quina és la Dosi de Referència Oral (RfDo). La RfDo s'expressa normalment en mg del tòxic avaluat per kg de pes corporal per dia (mg/kg/dia). La US EPA defineix la RfDo com l'estimació de l'exposició diària de la població humana a un agent tòxic que no presenta un risc apreciable d'efectes adversos per a la salut durant tota la vida. L'EPA no ha descrit cap RfDo per a l'alumini, tot i que sí que ha donat una RfDo per al fosfit d'alumini ($AlPO_3$) de 0,0004 mg/kg/dia (ASTDR, 2008).

El Panell d'Experts en Additius Alimentaris, Aromatitzants, Coadjuvants Alimentaris i Materials en Contacte amb els Aliments ha considerat necessari d'establir un valor de la ingesta setmanal tolerable (IST) d'alumini d'1 mg/kg pes corporal/setmana (EFSA, 2008), per l'acumulació que es produeix d'alumini a través de la dieta. La FDA ha determinat que els nivells d'alumini utilitzats com a additius alimentaris i en la medicació (antiàcids) no constitueixen un risc per a la salut en general. Així mateix, l'EPA recomana un límit de 0,05 a 0,2 mg/L d'alumini en l'aigua potable (ASTDR, 2008). D'altra banda, l'Administració de Salut i Seguretat Ocupacional (OSHA) ha determinat que la quantitat d'alumini acceptable en la pols que respiren els treballadors no pot excedir de 15 mg/m³ en la pols total i de 5 mg/m³ en la fracció respirable de l'aire d'una jornada diària de treball (ASTDR, 2008).

2. NEUROTOXICITAT DE L'ALUMINI

2.1. NEUROTOXICITAT DE L'ALUMINI

Els efectes neurotòxics de l'alumini van ser observats per primera vegada al segle XIX per Orfila i Sem, després de l'administració per via parenteral d'algunes sals d'alumini, i posteriorment el 1897, en veure's que una injecció directa de tartrat d'alumini ($C_{12}H_{12}Al_2O_{18}$) al cervell de conills produïa neurodegeneració (Döllken, 1897; Altmann, 2001; Gonçalves i Silva, 2007).

El primer estudi en humans va ser portat a terme per Spofforth (1921), estudi que va ser publicat en la revista *Lancet* i en el qual es detectaren efectes neurològics a l'exposició a alumini. El 1962 també s'observaren síndromes neurològics i efectes neurotòxics en miners i treballadors de fonderies exposats per inhalació d'alumini. Posteriorment, el 1972, va trobar-se una relació entre l'exposició a l'alumini i la encefalopatia per diàlisi (quadre neurològic típic de pacients sota diàlisi que dona lloc a alteracions cognitives i del llenguatge), i el 1973 es va relacionar l'exposició al metall amb la malaltia d'Alzheimer (McLaughlin i col·l., 1962; Alfrey i col·l., 1972; Crapper i col·l., 1973; Gonçalves i col·l., 2007).

Tot i que l'alumini no es considera un metall essencial, les concentracions d'alumini trobades en el cos humà són suficients per produir efectes neurotòxics i modificar l'activitat de certs enzims i alterar les vies de senyalització intracel·lular (Bondy, 2010).

Actualment, són molts els estudis científics que mostren una correlació entre diverses formes químiques de l'alumini i l'aparició de neurotoxicitat i neurodegeneració, així com s'intenta eludir quin és el seu mecanisme d'acció.

S'han de tenir diverses consideracions a l'hora d'avaluar els efectes neurotòxics de l'alumini. Per als estudis *in vivo*, s'han de considerar la dosi, la ruta d'administració i l'especiació de l'alumini. Generalment, en els estudis toxicològics amb rosegadors, s'utilitzen dosis que corresponen a unes 10-20 vegades a la que es trobarien exposats els humans. Això és degut a que es té en consideració el major metabolisme dels rosegadors.

2.1.1. L'alumini al sistema nerviós central

2.1.1.1. Entrada de l'alumini al cervell

L'alumini pot penetrar al cervell des de la sang a través de la barrera hematoencefàlica (BHE) i també s'ha suggerit el seu pas a través dels plexes coroides. L'entrada d'alumini al cervell a través de la BHE es pot produir a través de tres mecanismes:

- Mitjançant la unió d'alumini a la proteïna transferrina.
- Per formació de complexos amb el citrat.
- Mitjançant l'alteració de la BHE.

Existeixen evidències que mostren que l'alumini també pot entrar al cervell per la cavitat nasal, l'única zona per on el sistema nerviós central es troba exposat a l'ambient, mitjançant el tracte olfatori, a través del líquid cefaloraquídi. L'absorció d'alumini a través d'aquesta via donaria lloc inicialment a una major acumulació d'alumini en el bulb olfatori i posteriorment hi hauria un augment en el teixit cerebral (Perl i col·l., 1987; Divine i col·l., 1999; Yokel, 2000; Yokel, 2002).

Un cop a la circulació sanguínia, l'alumini pot unir-se a la transferrina i formar el complex Al-transferrina, que pot penetrar la BHE a través de receptors específics d'alta afinitat per la transferrina que es troben a la superfície de la membrana, un sistema que fisiològicament serveix per proveir de ferro les neurones i les cèl·lules glials.

Aquesta entrada d'alumini dins el sistema nerviós central donaria lloc a alteracions de les propietats fisiològiques de les membranes cel·lulars, a alteracions dels canals iònics dependents de voltatge i a alteracions en la secreció de neurotransmissors (Donalds i col·l., 1989).

Per protegir el cervell dels efectes tòxics de l'alumini, la BHE conté transportadors específics que permeten la sortida de l'alumini del teixit cerebral. L'alumini és transportat des del cervell fins a la sang en forma de complex amb el citrat. Aquesta sortida es dona a través d'un transportador monocarboxílic localitzat a la superfície de la BHE (Ackley i Yokel, 1997; Yokel i col·l., 2000). Un desequilibri entre l'entrada i la sortida del metall produiria un augment dels nivells d'alumini al cervell, exercint així els seus efectes neurotòxics (Zheng, 2001).

L'entrada de l'alumini a les neurones i cèl·lules gials es donaria també a través del transport per part de la transferrina. Estudis amb cultius cel·lulars han mostrat que el complex Al-transferrina pot penetrar de 4 a 10 vegades més ràpid en neuroblatomes i en oligodendrites que no pas altres compostos d'alumini de menor pes molecular.(Shi i Haug 1990). Així mateix, en rates crònicament exposades al complex Al-glutamat per via subcutània, es va observar que l'alumini era acumulat majoritàriament al còrtex, l'hipocamp i l'amígdala, zones cerebrals que contenen una gran concentració de receptors per a la transferrina. Aquesta mateixa distribució, es va trobar també en un estudi *post-mortem* dels cervells de pacients d'Alzheimer (Deloncle i Pages, 1997; Szutowicz, 2002).

D'aquest alumini que s'interioritza a les cèl·lules neuronals, el 70% es trobaria localitzat a la fracció post-mitocondrial de les neurones: citosol, reticle endoplasmàtic i lisosomes (Shi i Haug, 1990).

2.1.1.2. Efectes de l'alumini al sistema nerviós central

Un cop l'alumini ha penetrat a l'organisme i degut a les seves propietats químiques, el metall pot unir-se a diferents components de les membranes cel·lulars, afectar les propietats físiques de les membranes, com la seva fluïdesa, produir canvis funcionals de les proteïnes integrals de membrana, alterant així diversos processos biològics associats a les membranes fosfolipídiques.

Els grups fosfat (PO_4^{2-}), carboxilat (COO^-) i hidroxil (OH^-) tenen una gran capacitat per reaccionar amb Al^{3+} . L'alumini, com a catió trivalent, pot unir-se als grups PO_4^{2-} del DNA, l'RNA, lípids de membrana i l'ATP, així com afectar l'activitat enzimàtica de proteïnes quinases i fosfatases. Així mateix, l'alumini pot unir-se a certs residus d'aminoàcids de proteïnes com Tyr, His i aminoàcids fosforilats, que permeten la unió del metall a certes proteïnes biològicament importants, donant lloc a canvis en la seva conformació o a la formació d'agregats de proteïna (Verstraeten i Oteiza, 2000). L'alumini, s'uneix a les proteïnes, causant la seva agregació o produint canvis en la seva estructura i inhibint la degradació de les proteïnes per part de les proteases (**taula. 2**).

Taula 2. L'alumini indueix canvis conformacionals de varies proteïnes

<i>Proteïnes del citoesquelet</i>
MAP1A
MAP1B
TAU
<i>Proteïnes relacionades amb malalties</i>
A β 1-40
A β 1-42
A β 25-35
A β PP
α -sinucleïna
Tau hiperfosforilada
<i>Altres proteïnes</i>
Calmodulina
Transferrina
Glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6PD)
Calpaina
Hexoquinasa

Adaptat de Kawahara., *J Alzheimers Dis*, 2005.

Així mateix, també s'ha observat que l'exposició a alumini pot causar mort neuronal, tan *in vitro* com *in vivo* i es creu que l'apoptosis és un dels principals mecanismes de toxicitat per part de l'alumini en les cèl·lules (Banasik i col·l., 2005; Lukiw i col·l., 2005). També, s'ha observat que l'alumini pot alterar el transport axonal i inhibir la producció de diversos neurotransmissors (processos de neurotransmissió glutamatèrgica, GABAèrgica i acetilcolinèrgica). L'alumini altera la neurotransmissió, per inhibició de les enzimes responsables de la síntesi i ús dels neurotransmissors, així com al afectar les propietats físiques de les membranes sinàptiques relacionades amb l'alliberament i l'absorció d'aquestes molècules (Gonçalves i Silva, 2007).

Altrament, l'alumini pot induir la resposta inflamatòria al cervell (Campbell i col·l., 2004; Kawahara, 2005) i també és capaç d'unir-se a varies proteïnes d'unio a metalls i influir en la homeòstasis de certs metalls com el ferro, el manganès, el coure, el zinc i el calci i per tant, en tots aquells processos biològics en que es troben implicats, així com facilitant l'aparició de dany oxidatiu.

D'altra banda, també s'han estudiat els possibles efectes neurotòxics de l'alumini sobre el comportament i els òrgans cerebrals relacionats amb diferents funcions cognitives com la memòria i l'aprenentatge (hipocamp i còrtex temporal), i també s'ha estudiat l'efecte de l'alumini sobre les capacitats motores (Styrus-Ponsar i col·l., 1997).

La importància dels estudis sobre el comportament resideix en el fet que la conducta pot ser considerada com la producció neta de les funcions sensorials, motores i cognitives que es donen en el sistema nerviós, que representa la integració funcional del SNC, i que per tan, és un punt final potencialment sensible a la neurotoxicitat induïda per tòxics. Molts trastorns del comportament, particularment de la memòria i les capacitats motores es troben associades a alteracions dels nivells de certs neurotransmissors. La pèrdua de memòria és un dels símptomes inicials en la MA o la encefalopatia per diàlisi i aquesta s'ha associat amb canvis fisiològics en regions de l'hipocamp riques en neurones colinèrgiques.

Tant estudis epidemiològics com en animals d'experimentació han mostrat que l'exposició a alumini dona lloc a alteracions del comportament (Rifat i col·l., 1990; Golub i German, 2001; Roig i col·l., 2006; Ribes i col·l., 2008; Ribes i col·l., 2010). Tot i així, en humans, l'exposició a nivells significatius d'alumini no es correspon amb grans alteracions de la funció cognitiva. Tanmateix, s'ha mostrat que les persones amb problemes en la funció renal desenvolupen síndromes neuropsicològics per exposició a alts nivells d'alumini, mentre que les persones amb una funció renal normal toleren alts nivells del metall (Buchta i col·l., 2003).

Kaneko i col·l. (2007) va demostrar que, en animals d'experimentació exposats al metall, les alteracions de la memòria espacial (memòria que es troba relacionada amb l'orientació espacial) dependrien de l'acumulació del metall al cervell, i els seus efectes dependrien del compost d'administració, sent l'absorció de l'alumini i els dèficits cognitius trobats, majors quan l'alumini es trobava en forma de complex.

Tot i així, els resultats dels estudis conductuals han estat contradictoris, i tant en certs estudis epidemiològics com en certs estudis amb animals d'experimentació s'han trobat conclusions que neguen una relació entre l'exposició a l'alumini i l'aparició d'alteracions conductuals (Domingo i col·l., 1996; Colomina i col·l., 2002; Molloy i col·l., 2007).

2.2. EFECTES PROOXIDANTS DE L'ALUMINI

2.2.1. Conceptes generals

L'estrès oxidatiu es podria definir com un desequilibri entre la producció de radicals lliures i la capacitat de la cèl·lula per defensar-se davant del dany oxidatiu mitjançant antioxidants i enzims detoxificants com són la superòxid dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) i el glutatió (GSH). Quan es dona aquest desequilibri, les molècules oxidades (lípid, proteïnes i nucleòtids) s'acumulen a l'interior de la cèl·lula i produeixen diferents alteracions cel·lulars, i a vegades la mort cel·lular.

Els radicals lliures són molècules o fragments de molècules que contenen un o més electrons desaparellats en els seus orbitals atòmics. Aquests electrons desaparellats donen una gran reactivitat a aquestes espècies.

De tots els diferents tipus de radicals que es poden formar, els radicals d'oxigen (ROS) són les espècies radicalàries que es generen en major importància en l'organisme (Valko i col·l., 2007). L'oxidació de les biomolècules per part de l'oxigen implica successives reduccions de l'oxigen molecular cap a diferents intermediaris: el radical superòxid ($O_2^{\cdot-}$), peròxid d'hidrogen (H_2O_2), i el radical hidroxil ($\cdot OH$).

Sota condicions fisiològiques, els radicals lliures són productes del metabolisme cel·lular. El metabolisme oxidatiu mitocondrial, el metabolisme dels fosfolípids i els ions metàl·lics són les principals fonts de radicals lliures. Tot i així, sota certes condicions tant fisiològiques com externes (exposició a un tòxic) n'augmenten els nivells de producció, i poden ser perjudicials per al cos humà.

El cervell és un òrgan extremadament sensible al dany oxidatiu, i això és deu a diversos factors. D'una banda, el cervell és un òrgan amb un gran consum d'oxigen que conté una elevada concentració d'àcids grassos fàcilment oxidables. De l'altra, en el teixit cerebral s'hi troben presents ions metàl·lics (ferro, coure) amb una gran capacitat redox. La presència de ferro al cervell és molt important, ja que pot reaccionar amb l'oxigen i generar $O_2^{\cdot-}$, que a la vegada és capaç de generar $\cdot OH$, que és capaç d'iniciar l'oxidació de diferents substrats orgànics. Tanmateix es formaria Fe^{3+} , que pot induir l'oxidació de lípids.

El dany oxidatiu produït per ROS és un dels mecanismes principals involucrats en el desenvolupament de diverses malalties neurodegeneratives, com la MA (Halliwell, 2006; Molina-Holgado i col·l., 2007). Un dels principals factors de risc en la majoria de les malalties neurodegeneratives és l'edat, que es troba directament relacionada amb l'aparició de dany oxidatiu, ja que amb l'edat es produeix una disminució de l'activitat dels enzims antioxidants responsables de la defensa davant l'estrès oxidatiu i es produeixen alteracions en el metabolisme cel·lular. Les principals alteracions que trobem en la majoria de malalties neurodegeneratives són: funció mitocondrial alterada, un augment del dany oxidatiu, metabolisme del ferro alterat, excitotoxicitat, processos inflamatoris i la presència d'agregats de proteïna. Tots aquests processos poden donar lloc a la mort neuronal.

2.2.2. Alumini i estrès oxidatiu

Tot i que, a diferència d'altres metalls de transició com ara el ferro, l'alumini no té propietats redox, s'ha demostrat que pot actuar com a agent prooxidant tant *in vivo* com *in vitro*. S'ha demostrat que l'alumini és capaç d'interaccionar amb espècies actives d'oxigen i amb les membranes lipídiques i que pot estimular la capacitat oxidant del $O_2^{\cdot-}$ i generar $\cdot OH$ i H_2O_2 .

L'alumini és capaç de facilitar la peroxidació lipídica dependent de ferro (Gutteridge i col·l., 1985), la peroxidació lipídica no dependent de ferro (Verstraeten i Oteiza., 2000), l'oxidació del NADH (Kong i col·l., 1992) i la formació d' $\cdot OH$ sense estar mediat pel ferro (Mendez-Alvarez i col·l., 2002). Així mateix, pot facilitar l'aparició de radicals lliures per part d'altres agents prooxidants.

El ferro i el coure, metalls presents en molts compartiments cel·lulars, són coneguts per les seves propietats prooxidants. L'alumini, pel al seu radi iònic, pot competir amb aquests metalls per unir-se a les biomolècules i facilitar l'aparició de dany oxidatiu per part d'aquests metalls de transició mitjançant un seguit de reaccions químiques com la reacció de Fenton i de Haber-Weiss (Campbell, 2006).

L'alumini, com ja hem comentat, pot potenciar la peroxidació lipídica induïda pel Fe^{2+} . La peroxidació és major a pHs més àcids (pH=5,5), i amb l'edat i en processos neurodegeneratius com la MA es donen processos inflamatoris que disminueixen el pH fisiològic a un de més àcidic (Xie i Yokel, 1996; Yoshino i col·l., 1999).

S'ha observat també que l'alumini podria afectar les mitocòndries cel·lulars. Les mitocòndries són orgànuls encarregats de subministrar energia en forma d'ATP a la cèl·lula, i són unes grans consumidores d'oxigen. Les mitocòndries sota condicions fisiològiques generen ROS a través de la cadena transportadora d'electrons. L'alumini s'ha vist que pot unir-se a fosfats (PO_4^{2-}) i a altres donadors d'oxigen i formar complexos estables que poden alterar l'activitat enzimàtica a la mitocòndria i afectar la cadena transportadora d'electrons (Bosetti i col·l., 2001; De Marchi i col·l., 2004; Kumar i Kiran., 2009).

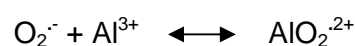
Alguns estudis amb animals d'experimentació han trobat una correlació entre l'administració d'alumini i un augment de la peroxidació lipídica. Deloncle i col·l., (1999) van observar una major acumulació d'alumini i una major producció d'espècies reactives a l'àcid-tiobarbitúric (TBARS) en el cervell de rates tractades crònicament amb el complex Al-glutamat. Com a mecanisme d'acció, es va proposar a la disrupció del ferro dels seus llocs d'unió intracel·lulars per part de l'alumini i també a l'activació de la reacció de Fenton. Swaim i Chainy (1998) també van trobar un increment de la peroxidació lipídica (TBARS) i alteracions dels nivells de certs enzims antioxidants, com la SOD i la CAT.

Actualment, diferents estudis han mostrat una relació significativa entre l'exposició a alumini i l'aparició de dany oxidatiu (Nehru i Anand, 2005; Esparza i col·l., 2005; Gomez i col·l., 2005; Kaneko i col·l., 2007).

2.2.2.1. L'alumini estimula la capacitat oxidant del $\text{O}_2^{\cdot-}$

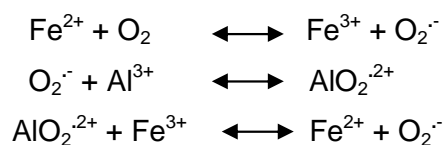
Alguns metalls redox són capaços de formar complexos superòxid. La capacitat oxidant d'aquests compostos està relacionada amb l'energia d'unió entre el metall i el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, que a la vegada depèn de l'acidesa de Lewis del metall i del seu radi iònic (ex.: $\text{Ga}^{3+} > \text{Sc}^{3+} > \text{Y}^{3+} > \text{La}^{3+}$).

S'ha proposat l'existència d'espècies d'oxoalumini; de la formació d'un radical superòxid d'alumini ($\text{AlO}_2^{\cdot-}$) que explicaria l'activitat prooxidant de l'alumini:



La possibilitat d'existència d'aquest complex es mostra en un estudi, en el qual Kong i col·l., van mostrar que el rang d'oxidació de l'NADH augmentava en presència d'alumini. Van trobar que l'enzim SOD inhibia solament l'efecte produït per l'alumini i no el dany oxidatiu basal, mentre que la CAT no hi tenia cap mena d'influència (Kong i col·l., 1992). Posteriorment, altres autors van descriure la possibilitat de l'existència d'aquest complexa en trobar els mateixos resultats, així com la possibilitat d'altres complexos amb altres metalls trivalents ($La^{3+} < Y^{3+} < Sc^{3+} < Ga^{3+} = Al^{3+}$) (Meglio i Oteiza., 1999, Exley 2004).

Així mateix, també s'ha proposat que l' AlO_2^{2+} podria facilitar la peroxidació lipídica induïda per ferro:



La unió de Al^{3+} amb $O_2^{\cdot-}$ per formar el radical $AlO_2^{\cdot 2+}$ podria donar lloc a un cicle redox en què el Fe^{3+} tornés a ser reduït a Fe^{2+} , que podria ser oxidat a H_2O_2 , facilitant la reacció de Fenton.

Tot i que encara no s'ha confirmat l'existència d'aquest radical, existeixen moltes evidències que donen suport a la seva presència i a la seva capacitat oxidant (Exley, 2004).

2.2.2.2. L'alumini facilita l'oxidació de les membranes

S'ha mostrat la capacitat de l'alumini per interaccionar amb les membranes cel·lulars. L'alumini és capaç d'unir-se a les membranes lipídiques, particularment a aquelles amb càrrega negativa, i alterar les seves propietats químiques, alterant com a conseqüència els processos de transport i el metabolisme cel·lular.

L'alumini té una gran afinitat per als donadors d'oxigen. El fosfat inorgànic, així com les biomolècules que contenen fosfat en la seva estructura química són uns bons lligands per a l'alumini.

Les sals d'alumini poden accelerar la peroxidació de les membranes lipídiques induïda per Fe^{2+} a pHs àcids. La unió de l'alumini a les membranes pot provocar la reorganització dels fosfolípids de membrana i fer-la més vulnerable als atacs dels radicals lliures.

In vitro, s'ha provat com l'alumini és capaç d'incrementar la rigidesa de les membranes cel·lulars. En liposomes, s'ha provat com l' Al^{3+} promou la formació de clústers de fosfolípids carregats negativament, efecte que es troba correlacionat amb la capacitat del Al^{3+} per estimular la peroxidació lipídica iniciada pel Fe^{2+} (Verstraeten i Oteiza, 2000). Verstraeten i Oteiza (1997) han mostrat que en liposomes de fosfatidilcolina i fosfatidilserina, la interacció de l'alumini amb els grups polars de les membranes fosfolipídiques, es dona a través de la formació de complexos amb estructura química *cis* i *trans*. Mentre que la configuració *trans* no es troba implicada en l'estimulació de la peroxidació lipídica, les interaccions *cis* indueixen la reorganització dels fosfolípids carregats negativament, amb la successiva formació de microdominis enriquits en fosfolípids. Mitjançant aquest procés, els fosfolípids adopten un estat enèrgicament favorable dins la bicapa lipídica, alliberant molècules d'aigua. Aquesta nova disposició dins la bicapa dona lloc a la immobilització dels fosfolípids involucrats en la unió dels metalls a la membrana, de forma que l'alumini causa l'acumulació local de substrats oxidables i facilita la peroxidació lipídica (Oteiza i col·l., 2004). En un altre estudi, Oteiza (1994) també va provar que els efectes prooxidants de l'alumini incrementaven a pHs menors i amb l'augment de la densitat de càrrega negativa formada als liposomes.

2.2.2.3. L'alumini altera l'activitat dels enzims antioxidants

Els organismes aeròbics, per protegir-se davant l'exposició a radicals lliures, han elaborat tot un seguit de mecanismes fisiològics tant preventius com reparadors. Les defenses enzimàtiques antioxidants inclouen un seguit de metaloenzims, la funció dels quals és de protegir el medi intracel·lular mitjançant la degradació dels productes de l'oxidació cel·lular. Dins d'aquest grup, inclouríem els enzims **SOD**, glutatió peroxidasa (**GPx**), glutatió reductasa (**GR**) i la **CAT**. Dins d'un segon grup d'antioxidants no enzimàtics trobaríem el **GSH**, que és un tripèptid i una de les molècules antioxidants més importants.

La primera línia de defensa davant el dany oxidatiu es dona per part de la SOD, que converteix el $O_2^{\cdot -}$ (el radical més abundant que es forma) en H_2O_2 , perquè pugui ser eliminat per la CAT i la GPx en forma d'aigua. Posteriorment, la CAT i la GPx són els enzims encarregats de la detoxificació, en eliminar l' H_2O_2 formada. Que actui majoritàriament la CAT o la GPx dependrà del teixit i de la concentració de H_2O_2 (fig. 1).

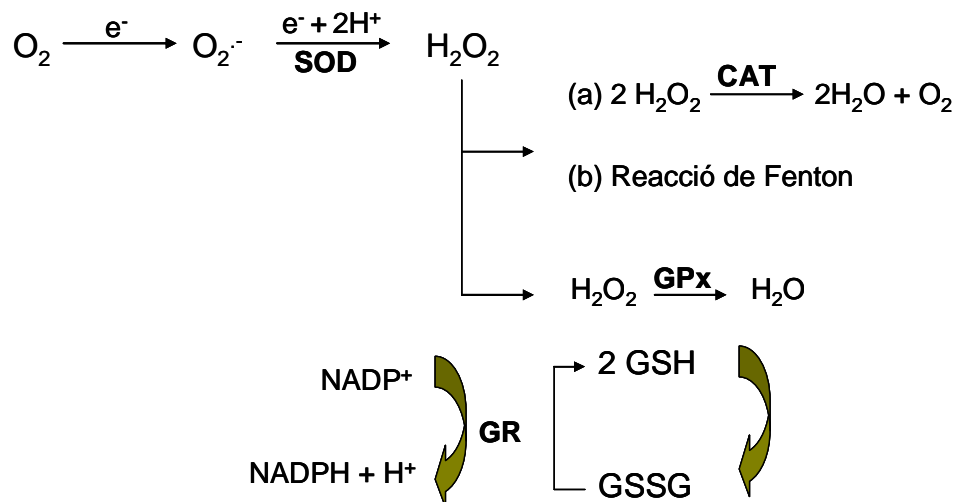


Figura 1. Sistema antioxidant. Adaptat de Reiter., *FASEB J*, 1995

Sota condicions fisiològiques normals, existeix un balanç entre les activitats i els nivells intracel·lulars d'aquests antioxidants. Un desequilibri entre ells donaria lloc a una defensa ineficaç i, per tant, a alteracions fisiològiques.

S'ha observat que l'alumini és capaç d'alterar l'activitat de diferents enzims antioxidants:

Taula 3. Paper de l'alumini sobre el sistema antioxidant

Referència	Estudi	Resultat
Kumar, A.; Dogra, S.; Prakash, A., 2009	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat de SOD i CAT
Prakash, A.; Kumar, A., 2009	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat de SOD i CAT
Kumar, V.; Bal, A.; Gill, K.D., 2009	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat MnSOD
Sethi, P.; Jyoti, A.; Singh, R.; Hussain, E.; Sharma, D., 2008	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat de SOD i GPx
Khanna, P.; Nehru, B., 2007	<i>In vivo</i>	Diferents enzims alterats
Sharma, P.; Mishra, K.P., 2006	<i>In vivo</i>	Diferents enzims alterats
Gómez, M.; Esparza, J.L.; Nogués, M.R.; Giralt, M.; Cabré, M.; Domingo, J.L., 2005	<i>In vivo</i>	Diferents enzims alterats
Nehru, B.; Anand, P., 2005	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat de SOD i CAT
Esparza, J.L.; Gómez, M.; Nogués, R.M.; Paternain, J.L.; Mallol, J.; Domingo, J.L., 2005	<i>In vivo</i>	Diferents enzims alterats
Esparza, J.L.; Gómez, M.; Romeu, M.; Mulero, M.; Sánchez, D.J.; Mallol, J.; Domingo, J.L., 2003	<i>In vivo</i>	Diferents enzims alterats
Mićić, D.V.; Petronijević, N.D.; Vucetić, S.S., 2003	<i>In vivo</i>	Increment de l'activitat de SOD
Jia, Y.; Zhong, C.; Wang, Y.; Zhao, R., 2001	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat de SOD i GPx
Moumen, R.; Ait-Oukhatar, N.; Bureau, F.; Fleury, C.; Bouglé, D.; Arhan, P.; Neuville, D.; Viader, F., 2001	<i>In vivo</i>	Inhibició de l'activitat GPx
Shainkin-Kestenbaum, R.; Adler, A.J.; Berlyne, G.M.; Caruso, C., 1989	<i>In vitro</i>	Inhibició de l'activitat de SOD

2.3. ALUMINI I MALALTIA D'ALZHEIMER

2.3.1. Malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer (MA) és una malaltia neurodegenerativa que es caracteritza per una pèrdua selectiva de neurones a l'hipocamp i al còrtex cerebral i per una disminució de certs neurotransmissors, com l'acetilcolina, seguit per un deteriorament cognitiu global constituït per pèrdua de memòria, afàsia, desorientació i canvis de l'estat d'ànim i de la personalitat.

La malaltia d'Alzheimer és la demència més comuna que existeix actualment i el seu principal factor de risc és l'edat. Tot i així, diversos factors de risc es troben implicats en el desenvolupament de la malaltia: el 5% dels casos de l'aparició de la malaltia es deu a causes gèniques. S'han associat quatre gens amb un increment del risc de patir la malaltia: *AβPP* localitzat en el cromosoma 21, el gen de la prenilina 1 (*PSEN 1*) i de la prenilina 2 (*PSEN 2*) localitzats en els cromosomes 14 i 1 respectivament i el gen *ApoE* en el cromosoma 19.

Tanmateix, aquesta malaltia s'ha relacionat amb diversos factors ambientals, com el sexe (major índex d'aparició de la malaltia en dones), les ètnies i la regió geogràfica. Tanmateix, la malaltia s'ha relacionat amb factors nutricionals i amb l'exposició ambiental a metalls com l'alumini, el mercuri i el plom (Maynard i col·l., 2006; Shcherbatykh i Carpenter, 2007).

Des d'un punt de vista histopatològic, la malaltia es caracteritza per la presència dels cabdells neurofibril·lars (de l'anglès *neurofibrillary tangles*: NFT) a l'interior de les neurones i de les plaques senils (PS) a l'espai extracel·lular (**fig.2**) (Maccioni i col·l., 2001; Pearl, 2010; Querfurth i Laferla, 2010). Aquestes estructures es troben presents en les regions cerebrals del còrtex temporal i l'hipocamp (situat a la superfície mitjana del lòbul temporal i relacionat amb la consolidació de la memòria i la capacitat d'aprenentatge).

Els cabdells neurofibril·lars estan formats per parelles de filaments encreuats helicoidalment, els quals són formats principalment per la proteïna associada a microtúbuls TAU. Les PS apareixen com a precipitats proteics constituïts principalment

per una zona central de depòsits del pèptid β -amiloide ($A\beta$), que es troba normalment envoltada de neurites distròfiques (terminacions neuronals degenerades), astròcits i microglia activada.

L'acumulació de pèptids de $A\beta$ s'ha considerat com el factor clau dins la patogènesi de la MA (hipòtesi amiloidea). Tot i que el mecanisme exacte mitjançant el qual $A\beta$ exerceix els seus efectes neurotòxics no és del tot clar s'ha considerat que l'estrès oxidatiu seria un dels seus principals mecanismes d'acció (Multhaup i col·l., 1997; Smith i col·l., 2002; Newman i col·l., 2007; Smith i col·l., 2007). Els pèptids de $A\beta$ estimulen l'aparició de dany oxidatiu de forma directa al actuar per si mateixos com a enzims i produir H_2O_2 i generar radicals lliures a partir de la reducció de ions metàl·lics. Tanmateix, $A\beta$ també pot induir la formació de radicals lliures per unió a proteïnes mitocondrials i a partir de processos inflamatoris.

Existeixen diferents isoformes del pèptid $A\beta$ d'entre 39 i 42 residus d'aminoàcid. Aquests es formen mitjançant proteòlisis per secretases a partir d'una glicoproteïna transmembrana: la proteïna precursora d'amiloide (de l'anglès *Amyloid precursor protein*: APP) (**fig.3**). L'APP és una proteïna transmembrana amb una regió extracel·lular de gran tamany, un domini transmembrana únic i una regió citoplasmàtica única.

El pèptid $A\beta$ 1-40 és el més soluble de les isoformes de $A\beta$, i es troba a concentracions nanomolars en el líquid cefaloraquídi. El pèptid $A\beta$ 1-42 és el menys abundant de les espècies, però és més insoluble que l'anterior. Tot i que el pèptid $A\beta$ 1-40 és la isoforma més abundant, la isoforma $A\beta$ 1-42 és la més tòxica i la que es troba majoritàriament sintetitzada en la malaltia d'Alzheimer. $A\beta$ 1-42, per la seva insolubilitat, té una gran capacitat per formar autoagregats i acumular-se al cervell (Maccioni i col·l., 2001; Smith i col·l., 2007).

S'ha relacionat la formació d'agregats de $A\beta$ amb l'aparició de dany oxidatiu. Aquesta correlació depèn de les propietats fisicoquímiques del pèptid, el qual exerceix una activitat tant prooxidant com antioxidant. Aquestes propietats de $A\beta$ es deuen a l'habilitat del pèptid per unir-se a metalls, i com a conseqüència a facilitar reaccions redox. El pèptid $A\beta$ 1-42 és una metal·loproteïna amb llocs d'unió per al Zn^{2+} , Cu^{2+} i Fe^{3+} (Gaeta i Hider, 2005).

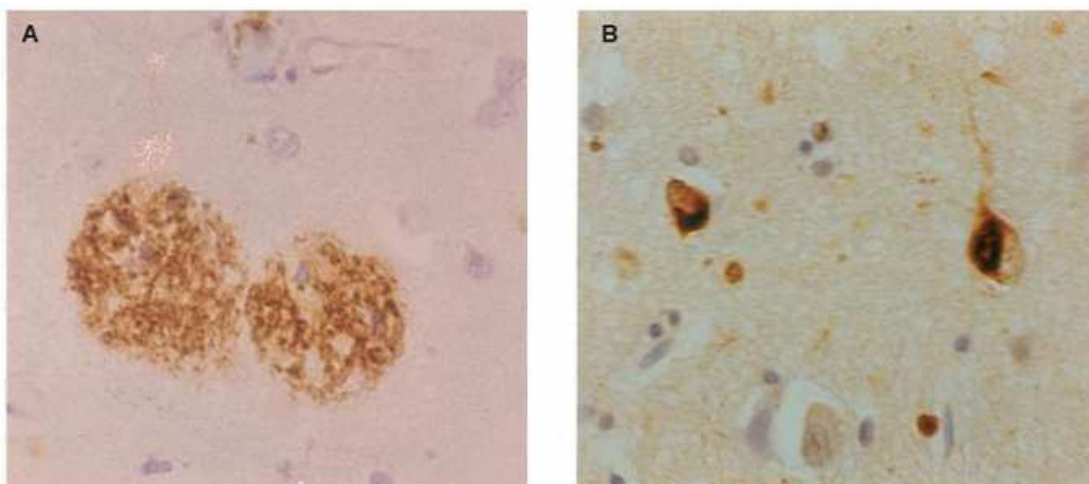


Figura 2. Anatomia de les (a) PS i els (b) cabdells neurofibril·lars.
Extret de Armstrong, R.A., *J Optom*, 2009

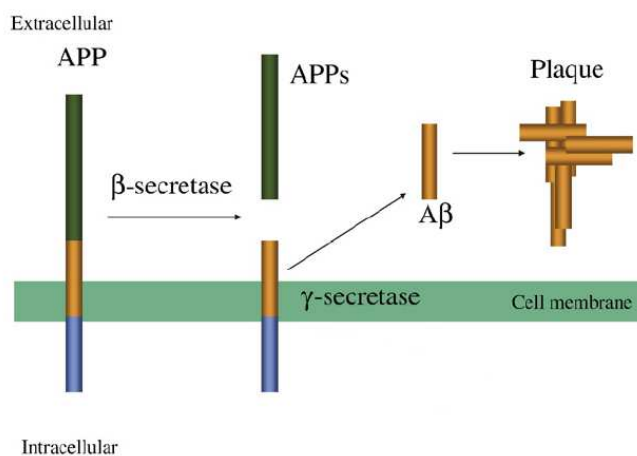


Figura 3. Formació del pèptid Aβ.
Extret de Newman i col·l., *Biochim et Biophys Acta*, 2007

2.3.2. Metalls i Alzheimer

L'estrès oxidatiu ha estat proposat com un dels principals mecanismes relacionats amb el desenvolupament de la MA. Les neurones són molt vulnerables al dany oxidatiu perquè tenen un baix contingut en glutatió (antioxidant natural) i perquè les seves membranes contenen nivells elevats d'àcids grassos poliinsaturats.

Els metalls tenen un paper actiu en la generació de radicals lliures. El cervell és un òrgan que acumula metalls, tot i així, conté tot un seguit de mecanismes per prevenir una acumulació desmesurada dels mateixos. Existeixen evidències que mostren que una mala homeòstasi de certs metalls essencials que es troben al cervell de forma natural com són el ferro, el coure i el zinc, contribueix al desenvolupament de la MA. Tanmateix, s'han trobat majors nivells cerebrals de metalls no essencials com ara l'alumini en el cervell de pacients amb Alzheimer en comparació amb gent sana (Crapper i col.l., 1973; Yokel, 2000).

L'acumulació d'aquests metalls (ferro, coure, zinc, i alumini) i la presència de radicals lliures donen lloc a canvis en l'acumulació de A β , el qual, a la vegada, quan es troba en la concentració suficient per produir estrès oxidatiu, indueix la seva pròpia producció i acumulació, i genera un cicle viciós (Molina-Holgado, 2007). Per tant, si la síntesi de A β és modulada per condicions de dany oxidatiu, la producció de A β pot considerar-se com una resposta a l'augment de l'estrès oxidatiu al cervell, a part de ser per ell mateix una font addicional de processos oxidatius.

A β és una metal·loproteïna, que per les seves propietats químiques, i concretament per la seva habilitat per unir-se a metalls, pot afavorir les reaccions redox. Això és degut a que el pèptid A β té en la seva estructura llocs d'unió per al zinc, el ferro i el coure. Els residus d'histidina (His6, His13 i His14) localitzats al sector N-terminal del pèptid i la Met35 localitzada a l'extrem C-terminal són crucials per a la unió dels metalls al pèptid (Finefrock i col.l., 2003; Gaeta i Hider, 2005) (**fig. 4**).

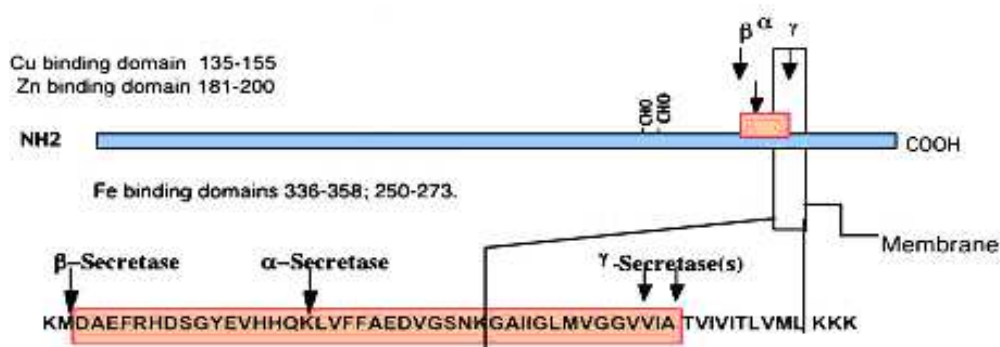
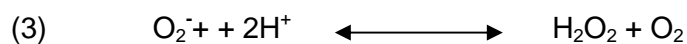
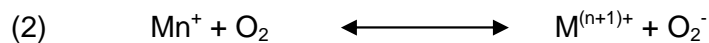
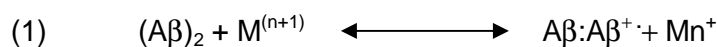


Figura 4. Estructura de la metal·loproteïna. APP i síntesi dels pèptids A β 1-40/42. Adaptat de Liu i col.l., *J Struct Biol*, 2006

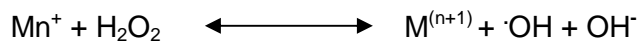
El coure és un metall essencial que actua com a cofactor de certs enzims que participen en reaccions redox, com la SOD i la citocrom oxidasa. Aquest metall interactua amb A β de dues formes diferents. D'una banda, el coure serveix com a cofactor de A β , facilitant la formació de H₂O₂ i, de l'altra, en medi àcid, facilita l'agregació del pèptid (Finerock i col·l., 2003). La formació de H₂O₂ i Cu⁺ és una condició ideal per induir l'aparició de radicals hidroxil (\cdot OH) a partir de la reacció de Fenton.

El ferro és un metall que s'ha trobat present en les PS, així com també s'hi ha trobat la presència de proteïnes relacionades amb el metall, com la proteïna transportadora de ferro transferrina i la ferritina (Markesbery, 1997). El ferro, s'ha vist que indueix l'agregació i que potència la neurotoxicitat de A β d'una forma similar al coure, mitjançant la producció de radicals hidroxil a través de la reacció de Fenton i Haber-Weiss's (Zatta i col·l., 2002; Valko i col·l., 2007).

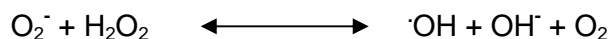
A β pot reduir el Cu²⁺ i el Fe²⁺ generant radicals lliures (H₂O₂ i \cdot OH) a partir del següent mecanisme:



generant radicals hidroxils mitjançant la reacció de Fenton:



i mitjançant la reacció de Haber-Weiss:



El A β radicalària reaccionaria amb l'O₂ i oligomeritzaria i formaria agregats insolubles (Liu i col·l., 2006).

Així mateix, el zinc és considerat com el major factor neuroquímic responsable de formar agregats de A β . Estudis *in vitro* van mostrar que el zinc a concentracions micromolars precipitava de forma ràpida A β a pHs neutres (Bush 1994; Finefrock i col·l., 2003). Altrament, també s'ha observat que el zinc, pot exercir una acció antioxidant, al inhibir la formació de H₂O₂, al competir amb el coure per als llocs actius del pèptid. Tot i així, aquesta acció no és un mecanisme eficaç per prevenir l'activitat neurotòxica de A β .

Altrament, el manganès és un metall essencial, que tot i que la seva relació amb la MA no ha estat molt estudiada, és un component necessari d'alguns metal·loenzims com la Mn-SOD i que participa en la funció neuronal (Burton i Guilarte, 2009).

Per últim, l'alumini s'ha considerat com a factor causal dins la patologia d'Alzheimer per la seva presència en el teixit cerebral de pacients amb Alzheimer (Christen, 2000), i és un dels metalls que més s'ha estudiat en relació amb la malaltia (Domingo, 2006; Scherbatykh i Carpenter, 2007).

2.3.3. Alumini i Alzheimer

La primera indicació significativa que va mostrar una relació entre l'exposició ambiental a l'alumini i el risc de desenvolupar Alzheimer es va donar el 1965 per Klatzo i col·l., en mostrar que l'administració intracranial d'alumini en animals d'experimentació (conills) provocava la degeneració de neurofilaments i l'aparició d'estructures similars als cabdells neurofibril·lars presents en pacients d'Alzheimer junt amb alteracions de la conducta i de l'aprenentatge. El 1973, Crapper i col·l., van trobar un increment d'alumini en els cervells de pacients d'Alzheimer i posteriorment, també a la dècada dels setanta es va mostrar que l'alumini era la causa principal de l'encefalopatia per diàlisi, malaltia que cursa amb dèficits cognitius (Alfrey i col·l., 1976), així com el 1980 Perl i Brody, van trobar acumulació d'alumini en els cabdells neurofibril·lars (Perl i Moalem, 2006).

Un altre fet remarcable que va fer pensar que l'exposició a alumini es podria relacionar amb el desenvolupament de la MA va ser la relació trobada entre els nivells d'alumini en l'aigua de beguda i la patogènesi d'Alzheimer. El 1980 es va portar a terme un estudi epidemiològic als Estats Units en el qual es va observar que els grups d'estudi que bevien aigua amb un major contingut de fluorur presentaven uns nivells

d'incidència d'Alzheimer menors. Els autors de l'estudi van concloure que el fluorur disminuïa la bioviabilitat de l'alumini present en l'aigua (Still i Keller, 1980). El 1986, en un estudi dut a terme a Noruega, es va mostrar què els majors nivells de mortalitat per demència es donaven en àrees en que l'aigua de beguda contenia majors nivells d'alumini (Vogt, 1986; Flaten, 2001). A partir d'aquestes i altres dades, es va suggerir que la presència i contingut de fluorur i silici en l'aigua, i també el seu pH podien estar relacionats amb els efectes tòxics produïts per l'alumini (Jacqmin i col·l., 1994; Jacqmin i col·l., 1996; Yokel, 2000). Actualment, existeix una àmplia literatura científica en la qual s'ha intentat estudiar la relació entre l'alumini present en l'aigua i la malaltia d'Alzheimer. La majoria d'aquests estudis es troben resumits en l'article de Flaten i col·l. (2001).

Al Canadà, el cos encarregat d'establir les directrius per a l'aigua de beguda nacionals (the Federal-Provincial Subcommittee on Drinking Water) va establir els límits operatius d'alumini en 100 µg/L en les plantes primàries o de tractament fisicoquímico que usaven coagulant d'alumini. Tot i així, per les limitades dades que es tenen i per les limitacions que impliquen les dades a partir d'animals d'experimentació, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) no ha considerat oportú encara crear una "Health-Based Guideline". Tanmateix, existeixen tot un seguit de propostes per minimitzar les concentracions residuals d'alumini en les aigües tractades com usar un pH òptim durant el procés de coagulació i fer una filtració eficient. D'altra banda, l'alumini és un dels 50 elements químics que es consideren contaminants prioritaris dins el programa de l'EPA per a l'aigua de la beguda. (OMS, 1998; Yokel 2000).

A partir d'aquí, i després de relacionar l'acumulació d'alumini amb certes estructures cerebrals associades al desenvolupament de la MA, s'han dut a terme nombrosos estudis per determinar la presència del metall a les PS i en els cabdells neurofibril·lars, la gran majoria dels quals es troben descrits en un *review* dut a terme per Yokel (Yokel, 2000). S'han proposat molts mecanismes d'acció mitjançant els quals l'alumini podria afectar el processament de Aβ, així com nombrosos estudis han investigat els efectes que l'alumini exerceix sobre l'APP i la proteïna tau.

El 1992, Shigamatsu i McGeer van provar que l'administració intracerebral de 0,04 µmols d'AlCl₃ en rates incrementava els nivells d'APP en les neurites afectades i la microglia activada. El 1995, Chong i Suh van testar 12 metalls dels quals només l'alumini a una concentració suprafisiològica (1 mM) era capaç de causar agregats

d'APP (Shigamatsu i McGeer, 1992; Chong i Suh, 1995). Tanmateix, mitjançant una tècnica combinada de microscòpia electrònica de transmissió (TEM) i espectroscòpia d'energia dispersiva de raigs X (EDX), Yumoto i col·l., van identificar la presència d'alumini i d'agregats de A β dins de PS en el hipocamp i còrtex cerebral de pacients amb Alzheimer (Yumoto i col·l., 2009).

La isoforma de A β soluble pot ser degradada per metal·loproteïnases dependents de calci. L'alumini, s'ha vist que pot desplaçar el calci i inhibir la degradació de A β , així com s'ha vist que l'alumini pot modificar l'estructura secundària i terciària de A β , incrementant la conformació de full-beta (β -sheet) del pèptid i, per tant, afavorint la seva agregació (Yokel, 2000). Igualment, s'ha vist que l'alumini pot afectar la isoforma A β 1-42 i formar un complex Al-A β 1-42 que és més citotòxic que l'anterior i és capaç d'afectar la BHE, augmentant l'habilitat de A β 1-42 per penetrar la membrana (Banks i col·l., 2006).

La proteïna tau, indueix la polimerització de la tubulina i estabilitza els microtúbuls de la cèl·lula. La fosforilació inadequada d'aquesta proteïna dóna lloc als coneguts cabdells neurofibril·lars. També s'ha trobat una relació entre l'alumini i la formació d'agregats de tau. El 1994, Harrington i col·l., van trobar un increment de la fosforilació de tau en relació amb un augment de la concentració d'alumini al cervell de pacients amb diàlisi (Harrington i col·l., 1994; Yokel 2000), i, més recentment, Walton (2007) va trobar, mitjançant l'ús de tècniques de tinció específiques, que les neurones piramidals d'hipocamp de cervells de persones amb MA contenien alumini, així com cabdells neurofibril·lars en el citoplasma de les mateixes.

El paper de la glia també ha estat molt estudiat en la MA, i s'ha mostrat la importància de la seva funció degradant els depòsits de A β . En aquest aspecte, diversos estudis han mostrat els efectes que l'alumini exerceix sobre els astròcits, alterant la seva funció i augmentant l'excitotoxicitat per glutamat, així com els astròcits s'han considerat la diana principal per la toxicitat de l'alumini (Aremu i Meshitsuka, 2006).

També s'ha estudiat la participació de l'alumini en els processos inflamatoris ja que s'ha observat que la micròglia activada, junt amb majors nivells de citocines i quimiocines, es troba present en la MA. S'ha observat que l'alumini facilita l'activació de NF-kB (Factor de transcripció kB) i provoca un increment en la producció de TNF- α (Factor de necrosi tumoral) (Campbell, 2006; Eikelenborm i col·l., 2006).

Actualment, la relació entre l'alumini i la MA continua sent contradictòria (Bondy, 2010). S'han realitzat estudis experimentals on els resultats no han mostrat una relació entre l'exposició a alumini i la MA, i mentre alguns investigadors conclouen que l'increment d'alumini trobat en els seus estudis és degut a contaminació, altres investigadors defensen els resultats trobats i neguen que siguin producte de la contaminació (Perl, 2001; Perl i Moalem, 2006). Tot i així, està extensament acceptat que l'alumini és un agent neurotòxic que pot causar alteracions cognitives i demència si entra al cervell, i per tan, és important continuar investigant els mecanismes neurotòxics del metall.

Un dels principals mecanismes neurotòxics que s'estan estudiant del alumini és el seu paper com a possible agent prooxidant i la seva implicació en la MA.

S'han dut a terme estudis *in vitro* que mostren la relació entre la capacitat oxidant de l'alumini i la seva relació amb la MA. Dins d'aquest propòsit, s'han estudiat els efectes de l'exposició d'alumini sobre les cèl·lules glials. En dur a terme una exposició a sulfat d'alumini ($Al_2(SO_4)_3$) en aquestes línies cel·lulars, es va trobar un increment de la formació de ROS, junt amb una activitat mitocondrial elevada (Campbell i col·l., 1999).

També existeixen tot un seguit d'estudis *in vivo* que relacionen el poder prooxidant de l'alumini amb els mecanismes implicats en el desenvolupament de la MA. En aquest aspecte, cal destacar l'ús de models animals específics per a la patologia d'Alzheimer, ja que constitueixen una eina important per identificar les dianes moleculars i cel·lulars, així com els canvis patològics que donen lloc a alteracions cognitives en la MA (Bharath i col·l., 2006; Newman i col·l., 2007). S'han desenvolupat diferents models de ratolins transgènics que mostren el fenotip observat en la MA i que permeten l'estudi dels efectes tòxics de diferents agents sobre l'APP, la proteïna tau i el pèptid A β (Newman i col·l., 2007).

El dany oxidatiu al sistema nerviós central es manifesta majoritàriament en forma de peroxidació lipídica, per l'alt contingut en àcids grassos poliinsaturats susceptibles a l'oxidació. Practicó i col·l., (2002) van dur a terme un estudi amb un model de ratolí transgènic, els ratolins Tg2576, que presentaven sobreexpressió de l'APP humana, i per tant, un increment de l'acumulació del pèptid A β a partir dels 9 mesos d'edat. Els animals van ser alimentats amb 2 mg d'alumini/kg dieta des dels 3 fins als 12 mesos d'edat. Els resultats van mostrar clares mostres de dany oxidatiu: un increment dels

nivells d'isoprostans (marcadors específics de la peroxidació lipídica *in vivo*) al cervell, correlacionats amb un augment de la formació i agregació de A β . Tanmateix, Practicó i col·l, ja havien trobat uns resultats similars en un estudi anterior en què també s'avaluaren els nivells d'isoprostans en orina i plasma (Practicó i col·l., 2001).

Més recentment, Walton (2007b) ha estudiat l'efecte de l'administració crònica d'alumini en un model animal de rata per a la MA que mostra deterioració progressiva de la memòria i una conducta similar a la que trobem en la MA. Els resultats de l'estudi mostren que l'alumini causava dany oxidatiu en regions del cervell que són vulnerables en la MA en humans. Així mateix, Drago i col·l (2008) han estudiat els efectes de l'alumini en un model animal per a la MA, triple transgènic, que presenta canvis fenotípics típics de la malaltia, com són les plaques de A β i els cabdells neurofibril·lars. Els resultats de l'estudi van mostrar que, de tots els metalls que estudiaven l'alumini era l'únic que s'acumulava en el còrtex dels animals, així com van observar com el complexa Al-A β alterava la respiració mitocondrial.

3. MELATONINA I DESFEROXAMINA

3.1. MELATONINA I DESFEROXAMINA COM A POSSIBLES PROTECTORS

Per la importància que s'ha donat en els últims anys al paper que l'estrès oxidatiu té dins del desenvolupament de la MA, així com, l'efecte que una mala homeòstasi de certs ions metàl·lics endògens com són el ferro, el coure i el zinc o de metalls contaminants exògens com l'alumini exerceixen sobre el pèptid A β , nombrosos estudis han contemplat diverses estratègies terapèutiques per restablir l'homeòstasi dels metalls i disminuir el dany oxidatiu present en el cervell de malalts d'Alzheimer.

Com a possibles agents terapèutics s'han considerat certs quelants de metalls i antioxidants exògens. Els agents quelants s'usen per eliminar els metalls lliures que es troben en excés als teixits o bé l'homeòstasi dels quals es troba alterada. Per ser bons agents quelants, han de poder penetrar fàcilment la BHE i han de ser específics per al metall o metalls que volem neutralitzar, formant un complex amb el metall no tòxic que sigui fàcilment eliminable. Tanmateix, l'ús d'antioxidants externs permet atrapar i neutralitzar els radicals lliures i disminuir el dany oxidatiu.

3.2. MELATONINA

La melatonina (N-acetyl-5-metoxi-triptamina) és una hormona lipofílica, secretada majoritàriament per la glàndula pineal, i en menor quantitat a la retina, al tracte gastrointestinal i en limfòcits, que té diferents funcions fisiològiques i regula els canvis estacionals. En ser una molècula lipofílica, té facilitat per penetrar les membranes cel·lulars i actuar sobre diversos tipus de cèl·lules. Així, per exemple, es troba relacionada amb el control del somni, la regulació de la pressió sanguínia, amb certes funcions immunològiques, la regulació del ritme circadià, funcions retinals, control del creixement tumoral, com a protector ossi i com a reguladora de la secreció de bicarbonat al tracte gastrointestinal (Pandi-Perumal i col·l., 2006).

La melatonina se sintetitza a partir del triptòfan present a la circulació sanguínia, el qual és convertit via 5-hidroxitriptofan en serotonina i posteriorment en melatonina mitjançant una sèrie de reaccions enzimàtiques (**fig. 5**). En els mamífers, la biosíntesi

de la melatonina es troba regulada mitjançant el tracte retinohipotalàmic, que es projecta des de la retina cap al nucli supraquiasmàtic (SCN). D'aquí, les fibres nervioses es projecten a través del nucli paraventricular fins a l'espina dorsal, al gangli superior cervical, i d'aquest finalment fins als pinealòcits que són les cèl·lules encarregades de sintetitzar la melatonina mitjançant l'alliberació de la norepinefrina. La norepinefrina s'uneix als receptors β -adrenèrgics dels pinealòcits, activa l'adenilat ciclasa i indueix la síntesi dels enzims encarregats de sintetitzar la melatonina (Pandi-Perumal i col·l., 2006).

La melatonina és sintetitzada principalment durant la nit, i la seva secreció està regulada per cicles de llum/fosc. Un cop sintetitzada, la melatonina no s'acumula a la glàndula pineal, sinó que es difon cap als capil·lars sanguinis i al líquid cefaloraquídi. La melatonina penetra en el líquid cefaloraquídi a través del tercer ventricle, arribant a unes concentracions de 20 a 30 vegades majors que a la circulació sanguínia, tot i que aquests nivells disminueixen a mesura que l'hormona es distancia de la glàndula pineal, suggerint que és absorbida pel teixit cerebral.

Amb l'edat i en certes malalties neurodegeneratives, els nivells endògens de melatonina segregada disminueixen. A més, s'ha observat que els nivells de melatonina en sang i en el líquid encefaloraquídi es troben disminuïts en pacients d'Alzheimer de forma paral·lela amb la progressió de la malaltia.

De totes les seves propietats, el descobriment que la melatonina pot actuar com a molècula neutralitzadora dels radicals lliures i com a molècula antioxidant, en estimular l'activitat dels enzims antioxidants, ha incrementat l'interès per utilitzar aquesta hormona com a agent terapèutic, ja que, a més, la melatonina té una toxicitat molt baixa.

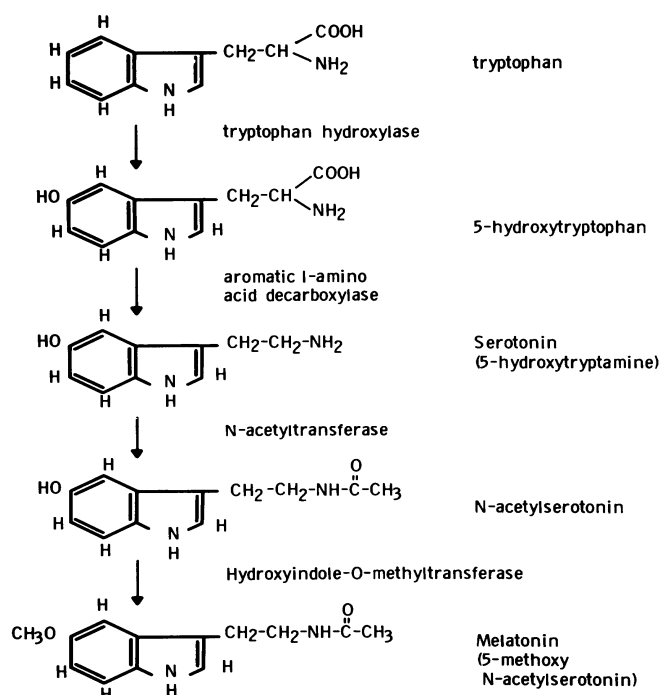


Figura 5. Biosíntesi de la melatonina.
Extret de Reiter i col·l., *Ann N Y Acad Sci.*, 1998

3.2.1. Efectes antioxidants de la melatonina

La primera vegada que es va mostrar la capacitat de la melatonina per reaccionar amb els radicals lliures va ser el 1993. Tan i col·l., van veure que la melatonina podia interaccionar amb els radicals $\cdot\text{OH}$ i neutralitzar-los (Tan i col·l., 1993). Es va proposar que la melatonina era capaç de donar un electró al radical $\cdot\text{OH}$ i formar un intermedi catiónic relativament estable que podria neutralitzar també els radicals $\text{O}_2^{\cdot-}$. Així mateix, altres autors també han estudiat la relació entre la melatonina i altres espècies radicalàries (Allegra i col·l., 2003).

La melatonina té propietats redox per la seva estructura química (presència d'un anell aromàtic electrodonador) i perquè els seus residus *O*-metil i *N*-acetil li donen la propietat de ser una molècula amfipàtica (Reiter i col·l., 2005). Així mateix, els metabòlits de la melatonina 3-hidroximelatonina (3-OHM), *N*1-acetil-*N*2-formil-5-metoxiquinurenamina (AFMK) i *N*-acetil-5-metoxiquinurenamina (AMF), també són potents neutralitzadors de radicals lliures, de forma que es crea una cascada antioxidant capaç de neutralitzar diverses molècules radicalàries (Reiter i col·l., 2004).

Per la seva naturalesa amfipàtica, a diferència d'altres antioxidants exògens que sols poden actuar en les membranes lipídiques o bé a l'interior cel·lular, la melatonina és capaç de protegir del dany oxidatiu tant a les membranes cel·lulars com molècules citosòliques i el DNA nuclear.

La melatonina pot actuar de forma directa davant del dany oxidatiu neutralitzant els radicals lliures, i de forma indirecta en promoure l'activitat dels enzims antioxidants. Mentre que per actuar de forma indirecta necessita la presència de receptors de membrana o receptors intracel·lulars, per neutralitzar els radicals lliures la melatonina no necessita receptors (Reiter i col·l., 2002; Reiter i col·l., 2003).

A part d'actuar com a neutralitzadora dels radicals lliures i d'incrementar l'activitat dels enzims antioxidants, la melatonina també exerceix les seves funcions antioxidants en actuar sinèrgicament amb altres antioxidants clàssics (Vitamina E, β -carotens, etc.) (Gitto i col·l., 2001), en estimular la síntesi de l'antioxidant GSH (Urata i col·l., 1999), en induir l'expressió gènica dels enzims antioxidants (Mayo i col·l., 2002; Esparza i col·l., 2005; Gómez i col·l., 2005) i en actuar a nivell de la mitocòndria (Acuña-Castroviejo i col·l., 2001; Reiter, 2003).

Els enzims antioxidants que han estat estudiats en relació amb la melatonina, han estat, la SOD (MnSOD i CuZnSOD), la CAT, la GPx i la GR. La primera font bibliogràfica que ens mostra com la melatonina era capaç d'incrementar l'activitat d'un d'aquests enzims, en concret la GPx, es va donar del 1995 (Barlow-Walden i col·l., 1995). A partir d'aquí, s'ha relacionat aquesta hormona amb l'activitat dels enzims antioxidants (Rodríguez i col·l., 2004).

Les propietats antioxidants de la melatonina han estat estudiades com a possible agent terapèutic front la MA. La melatonina pot reduir el dany oxidatiu induït per A β (Daniels i col·l., 1998), i s'ha vist que pot protegir les cèl·lules del dany oxidatiu tant *in vitro* com *in vivo* (Wang i Wang, 2006).

3.2.2. Efectes protectors de la melatonina davant la toxicitat de l'alumini

Diferents autors han estudiat els possibles efectes protectors de la melatonina davant el dany oxidatiu induït per l'alumini. Així, per exemple, actualment s'ha provat l'efecte antioxidant que la melatonina exerceix davant l'exposició a alumini *in vivo* (Esparza i

col-l., 2003; Esparza i col-l., 2005; Mahieu i col-l., 2009) i, *in vitro* (Reiter, 1998). Així mateix, s'ha estudiat el paper de la melatonina com a possible agent quelant de l'alumini, sent capaç d'unir-se al metall i formar una complex estable, que per tant podria actuar detoxificant l'alumini acumulat (Lack i col-l., 2001).

A causa dels nivells d'alumini més elevats que s'han trobat al cervell dels pacients amb Alzheimer (Roberts i col-l., 1998), i als efectes oxidatius d'aquest metall, la detoxificació del mateix mitjançant la melatonina ha estat considerada com una possibilitat terapèutica davant la MA.

3.3. DESFEROXAMINA (DFO)

L'augment continu de la presència de metalls al nostre medi, degut al gran desenvolupament industrial, facilita la presència d'intoxicacions en l'ésser humà i els animals. Tot i que la primera defensa davant l'acumulació d'alumini va dirigida a evitar la seva incorporació a l'organisme, un segon nivell d'actuació va dirigit a facilitar-ne la mobilització i a incrementar l'excreció del metall.

Davant la importància de trobar noves estratègies terapèutiques per poder fer front a certes malalties neurodegeneratives com la MA, ha augmentat l'ús i la troballa de nous agents quelants que permetin detoxificar els metalls lliures que es troben en excés o bé en dishomeòstasi en el cervell i que són responsables d'induir efectes neurotòxics.

S'entén com a agent quelant un compost que és capaç d'unir-se a un ió metàl·lic a través de dos grups funcionals, on cadascun d'aquests dona un parell d'electrons per formar un anell heterocíclic que rodeja el metall. Per formar aquest anell, el lligant necessita disposar de com a mínim dos àtoms donadors d'electrons.

La desferoxamina o DFO ($C_{25}H_{48}N_6O_8$) és una hidroxilamina aïllada de *Streptomyces pilosus*. Té gran afinitat pel ferro i baixa pel calci. La DFO és un agent quelant aprovat per la FDA per al tractament de l'excés de ferro al cos en malalties com la β -talassèmia, així com al comprovar-se que l'homeòstasi de ferro es trobava alterada en pacients amb Alzheimer (**fig. 6**). La majoria d'estudis en què es relaciona la DFO amb la MA s'han associat amb l'exposició a alumini, ja que aquest comparteix amb el ferro, a part del radi iònic, una densitat de càrrega i lligands de proteïna similars. De fet, la

selecció i el desenvolupament d'agents quelants per a l'alumini estan molt influenciats en els agents quelants que s'han desenvolupat per al ferro.

La DFO té l'avantatge que no s'uneix a altres metalls fisiològicament importants com el calci o el manganès, però també té desavantatges, com ara que la seva eficiència es troba limitada per la seva baixa habilitat per penetrar la BHE, ja que és un compost hidrofílic. Així mateix, s'absorbeix molt poc pel tracte gastrointestinal i es degrada molt fàcilment. De fet, la seva eficiència com a agent quelant sols es dona mitjançant administració parenteral, no oral.

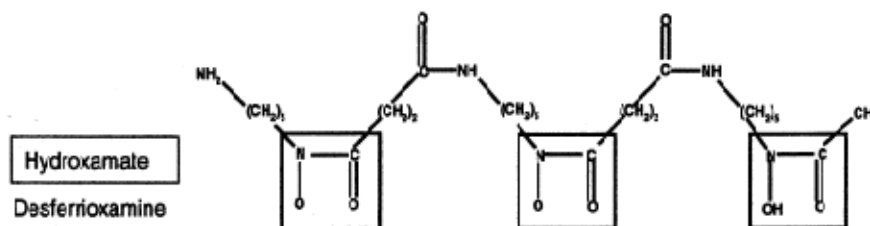


Figura 6.- Desferioxamina (grups funcionals). Extret de Yokel, *Coord Chem Rev*, 2002b

La DFO va ser inicialment investigada com a quelador d'alumini en pacients en hemodiàlisi que patien d'intoxicació crònica a alumini, i es va observar que podia reduir la mortalitat associada a la síndrome d'encefalopatia per diàlisi induïda pel metall (Yokel, 2002b). Així mateix, per provar l'efecte beneficiàl de la DFO en pacients amb Alzheimer, es va administrar 125 mg (0,19 mmol) de DFO per injecció intramuscular dos cops al dia durant 5 dies seguits. Els resultats van mostrar una disminució de la mortalitat i una menor deterioració cognitiva dels pacients tractats amb l'agent quelant. L'anàlisi dels metalls traça presents en l'autòpsia del cervell va confirmar que el tractament amb DFO disminuïa la concentració d'alumini en el teixit cerebral (McLachlan i col·l., 1993). Tanmateix podem trobar molta més literatura que mostra el potencial quelant de la DFO davant l'exposició a alumini (Yokel, 2002).

D'altra banda, s'ha mostrat que la DFO també pot actuar neutralitzant la formació de radicals lliures, que pot inhibir la peroxidació lipídica i la producció de radicals lliures ($\cdot\text{OH}$) (Guelman, 2004; Papazisis i col·l., 2008).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. HIPÒTESI

És ben conegut que l'alumini és un metall ubic, que per les seves propietats químiques pot interferir en el metabolisme cel·lular i donar lloc a diversos efectes neurotòxics en l'ésser humà. En els darrers anys s'han avaluat les propietats prooxidants de l'alumini, i s'ha observat que aquest metall és capaç d'alterar els diferents mecanismes antioxidants i d'incrementar la producció de radicals lliures.

Per la importància del dany oxidatiu en el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer i pel paper actiu que hi tenen certs metalls, és clau investigar la possible relació entre l'exposició a l'alumini i el desenvolupament de la malaltia d'Alzheimer des de diferents perspectives, tant a nivell bioquímic, com cognitiu.

En l'actualitat, s'estan estudiant possibles molècules antioxidants i nous agents quelants per intentar disminuir els efectes nocius de certs metalls, incloent-hi l'alumini. En aquest sentit, la melatonina és una molècula amb propietats antioxidants conegudes que actua com agent protector enfront la toxicitat de l'alumini. Així mateix, la desferoxamina (DFO) és un conegut agent quelant relacionat també amb propietats antioxidants.

D'acord amb aquests antecedents, la hipòtesi del present treball ha estat la següent:

La melatonina i la DFO exercirien un paper protector davant el dany oxidatiu produït per una exposició crònica a alumini, i també disminuirien les alteracions cognitives presents com a conseqüència de l'acumulació del metall en zones cerebrals relacionades amb la memòria i l'aprenentatge.

2. OBJECTIUS

2.1. OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat avaluar els efectes neurotòxics de l'alumini sobre el sistema antioxidant cel·lular en un model animal per a la malaltia d'Alzheimer (ratolins Tg2576), a més de valorar els canvis cognitius i conductuals produïts per l'exposició crònica a alumini a través de la dieta. Així mateix, estudiar el possible efecte protector de la melatonina i la DFO.

2.2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Determinar la concentració d'alumini i altres elements essencials (ferro, coure, zinc i manganès) en hipocamp, còrtex i cerebel, així com en els ronyons, fetge i fèmur de ratolins Tg2576 després d'una exposició a una dosi alta (1 mg d'alumini/g de pinso) i crònica de lactat d'alumini.
 2. Avaluar la peroxidació lipídica induïda per l'alumini en hipocamp, cerebel i còrtex de ratolins Tg2576, així com els sistemes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics després d'una exposició crònica a lactat d'alumini.
 3. Valorar el possible efecte protector de la melatonina i la DFO davant la peroxidació lipídica provocada per l'exposició a alumini, així com sobre els antioxidants enzimàtics i no enzimàtics.
 4. Estudiar l'expressió gènica dels enzims relacionats amb l'estrès oxidatiu i el metabolisme del glutatió.
 5. Avaluar l'activitat motora general dels ratolins Tg2576 i la seva capacitat de memòria i aprenentatge després d'una exposició a una dosi alta i crònica de lactat d'alumini.
-

MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIAL I REACTIUS

1.1. Model animal per a l'estudi de la malaltia d'Alzheimer: ratolins Tg2576

Es va escollir com a model animal d'experimentació el ratolí transgènic *APPSWE(2576)*. Aquests ratolins presenten una sobreexpressió de la isoforma APP₆₉₅ de la proteïna precursora de la β -amiloide (APP). Aquesta isoforma de l'APP es va trobar en una família sueca que presenta una variant de la MA d'aparició prematura. La isoforma 695 presenta una doble mutació que consisteix en un canvi dels aminoàcids Lys⁶⁷⁰ i Met⁶⁷¹ pels aminoàcids Asn i Leu respectivament.

El gen *APP* es troba localitzat en el cromosoma humà 21 i codifica per a la proteïna APP, la qual s'expressa al cervell, tot i que també en altres teixits. L'aparició de mutacions en aquest gen pot provocar alteracions del processament d'APP, com per exemple la doble mutació de la isoforma APP₆₉₅, que dóna com a resultat els ratolins Tg2576 que expressen altes concentracions de la proteïna A β (A β (1-40) i A β (1-42/43)), donant lloc a l'aparició de plaques de A β i a dèficits de memòria (Hsiao i col·l., 1995; 1996).

S'han trobat plaques de A β en els ratolins Tg2576 als 7-8 mesos d'edat, les quals es presenten majoritàriament en el còrtex i certes zones del hipocamp (subicle i presubicle) (Kawarabayashi i col·l., 2001) i augmenten ràpidament a partir dels 10-21 mesos d'edat. Igual que en els humans, les plaques es troben rodejades de microglia activada i astròcits (Frautschy i col·l., 1998; Wegiel i col·l., 2001). Tanmateix, aquests canvis histopatològics s'han vist correlacionats amb dèficits cognitius (Hsiao i col·l., 1996; Chapman i col·l., 1999). Hsiao i col·l., van descriure alteracions de l'aprenentatge i la memòria en aquests ratolins a partir dels 9 mesos d'edat mitjançant la prova Y Maze. Els resultats de la prova van mostrar una correlació entre les alteracions cognitives trobades i un increment en la concentració de A β i en l'aparició de plaques i depòsits d'amiloide (Hsiao i col·l., 1996).

Els ratolins Tg2576 són, doncs, un bon model animal per estudiar els efectes neurotòxics de l'alumini i la seva relació amb el desenvolupament de la MA, ja que presenten similituds amb les característiques patològiques i cognitives de la MA humana.

1.2. Animals d'experimentació

Com a animals d'experimentació, es van usar femelles Tg2576 (5 mesos d'edat a l'inici del tractament) procedents de l'encreuament entre mascles heterozigots per al genotip Tg2576 i femelles de soca salvatge o *wild*. Es van escollir les femelles per l'alta agressivitat entre els mascles.

Els mascles parentals (Tg2576) van ser subministrats per Taconic Europe (Dinamarca) i es van encreuar amb femelles *wild* (C57BL6/SJL) procedents de Charles River (Barcelona). Es disposa d'un permís d'encreuament per a aquests animals per part de Taconic Europe. Així mateix, l'estabulari de la FMCS està homologat pel Departament de Sanitat Animal de la Generalitat de Catalunya.

Els animals van ser acomodats a l'estabulari en gàbies Makrolon, sota condicions estàndards de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humitat relativa ($50\pm 10\%$) i un cicle de llum/fosc de 12 hores diàries (llum: 8.00-20.00 hores). Les cries es van mantenir acomodades junt amb les mares fins al seu deslletament (21 dies), moment en què es van sexar. Les femelles van ser genotipades i separades en diferents gàbies segons el seu genotip (Tg2576/*wild*).

Tots els procediments utilitzats en aquest estudi van ser aprovats per al comitè ètic d'investigació animal del centre, i es van seguir les normes per a la manipulació d'animals d'experimentació (Generalitat de Catalunya).

1.3. Reactius

- **Per al tractament**

- ✓ Pinso amb lactat d'alumini (Sigma Chemical CoA., St.Louis, EUA): Harlan Ibèrica
- ✓ Melatonina ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$) (Sigma Chemical CoA., St.Louis, EUA)
- ✓ Desferoxamina (DFO) ($\text{C}_{25}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_8$) (Novartis SA, Barcelona, Espanya)

- **Per a les digestions**

- ✓ Àcid nítric al 65% suprapur (HNO_3) (Merck Darmstadt, Alemanya)
-

• **Per a la valoració de l'estrès oxidatiu**

- ✓ Reactiu de Bradford: (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) B6916
 - ✓ Albúmina sèrica bovina (BSA): (Sigma Chemical CoA., St.Louis, EUA) A9647
 - ✓ Glutatió oxidat (GSSG): (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) G4501
 - ✓ Glutatió reduït (GSH): (Sigma Chemical CoA., St.Louis, EUA) G4251
 - ✓ Epinefrina: (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) E4375
 - ✓ Glutatió reductasa (GR): (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) 49755
 - ✓ Fosfat potàssic bàsic (K_2HPO_4) (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA)
 - ✓ Fosfat potàssic àcid (KH_2PO_4) (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA)
 - ✓ Àcid etildiaminotetracètic (EDTA): (Merck Darmstadt, Alemanya)
 - ✓ Fosfat dinucleòtid de nicotinamida-adenina reduït (NADPH): (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) N 7505
 - ✓ *t*-butilhidroperòxid (T-BuOOH): (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) T9889
 - ✓ Àcid tricloroacètic (TCA): (Panreac Química, S.A, Espanya) 131679
 - ✓ Fosfat sòdic bàsic (Na_2HPO_4): (Panreac Química, S.A, Espanya) 131067
 - ✓ Fosfat sòdic àcid (NaH_2PO_4): (Panreac Química, S.A, Espanya) 121677
 - ✓ *N-etil*-maleïmida (NEM): (Merck Darmstadt, Alemanya) 101308
 - ✓ *O*-phtalaldehid (OPT): (Merck Darmstadt, Alemanya) 111452
 - ✓ Hidròxid sòdic (NaOH): (Panreac Química, S.A, Espanya) 171561
 - ✓ Peròxid d'hidrogen, 30% (H_2O_2): (Merck Darmstadt, Alemanya) 8599
 - ✓ Carbonat sòdic bàsic (Na_2CO_3): (Merck Darmstadt, Alemanya) 6392
 - ✓ Carbonat sòdic àcid ($NaHCO_3$): (Merck Darmstadt, Alemanya) 6329
 - ✓ Àcid clorhídric (HCl): (Panreac Química, S.A, Espanya) 131019
 - ✓ Àcid tiobarbitúric (TBA): (Sigma Chemical CoA., St. Louis, EUA) T 5500
-

- **Per a la determinació de l'expressió d'mRNA**

Extracció de RNA

- ✓ Solució d'elució: (Applied Biosystems, Foster City, EUA) 4305893
- ✓ Solució de rentat d'RNA 1: (Applied Biosystems, Foster City, EUA) 4305891
- ✓ Solució de rentat d'RNA 2: (Applied Biosystems, Foster City, EUA) 4305890
- ✓ Solució de lisis: (Applied Biosystems, Foster City, EUA) 4305895
- ✓ PBS 1x a pH 7,2: (Invitrogen, Carlsbad, EUA) 20012-019
- ✓ RNase ZAP: (Ambion, Inc., Austin, EUA) AM 9780

Valoració de l'mRNA

Transcripció inversa

- ✓ High Capacity cDNA RT Kit with Rnase Inhibitor: (Applied Biosystems, Foster City, CA) 4374967:
 - 10X RT Buffer
 - 25X dNTP Mix
 - 10X RT Random primers
 - Multiscribe Transcriptasa
 - Rnase Inhibitor
 - Nuclease free H₂O

Real Time PCR

- ✓ Fast Universal PCR Master Mix, no amperase: (Applied Biosystems, Foster City, EUA) 4366072
 - ✓ 20X TaqMAN Gene Expression Assay Mix: (Applied Biosystems, Foster City, EUA) (CAT Mm00437992_m1, SOD Mm01344233_g1, GR Mm00833903_m1, 18s Hs99999901_s1), Taqman MGB probe (6-FAM dye-labeled).
-

1.4. Material

1.4.1. Aparells per a la realització de les proves cognitives i conductuals

- **Camp obert (*Open field*)**

Per a la realització del test del camp obert es va usar un recinte de fusta de superfície 1x1 m rodejat per una paret de 47 cm d'altura i obert per la part superior. Es van delimitar dues àrees: la perifèria, que inclou la distància des de la paret fins a 10 cm de l'interior, i l'àrea central, que inclou la resta de l'estructura (**fig. 7**).



Figura 7. Estructura del camp obert

- **Laberint d'aigua de Morris (*Water maze*)**

El laberint de Morris, prova que va ser descrita per primera vegada per Morris (Morris, 1984), consisteix en una piscina rodona d'1 m de diàmetre i una paret de 60 cm d'alçària, plena d'aigua a una temperatura constant de 22 ± 1 °C durant tot l'experiment. La piscina està dividida en quatre quadrants virtuals, en un dels quals hi ha una plataforma rodona submergida uns 1,5 cm per sota del nivell de l'aigua, la qual cosa impedeix la seva visualització per part dels ratolins (**fig. 8**). Les parets que envolten la piscina són de rajola blanca, i en algunes hi ha diferents senyals geomètriques.



Figura 8. Estructura del laberint de Morris

- **Càmera de vídeo**

Per al seguiment del recorregut dels animals tant en la prova de camp obert com en la prova del laberint de Morris, es va usar una càmera de vídeo (Sony CCD-IRIS model) acoblada a un suport sobre del recinte de fusta. Així mateix, la càmera es trobava connectada a un ordinador, amb el qual es va procedir a l'obtenció del resultat de la prova mitjançant el programa de software Etho-Vision[®] (Noldus Information Technologies, Wageningen, Netherlands) (**fig. 9**).

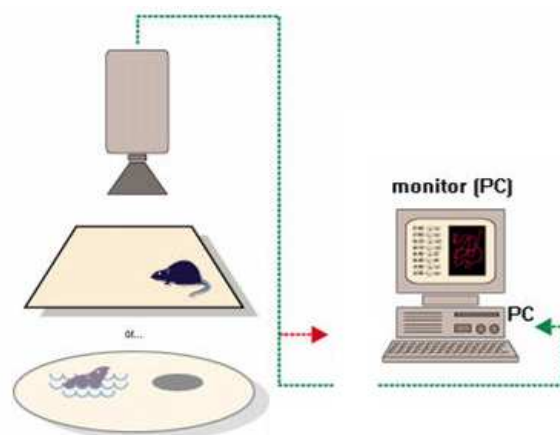


Figura 9. Esquema de les proves

1.4.2. Altres materials i instruments de laboratori

- ✓ Autoanalitzador Cobas Mira (Hoffman-la Roche Co., Basileal, Suïssa)
 - ✓ Espectofotòmetre Perkin Elmer Lambda 2, UV/VIS (Massachusetts, EUA)
 - ✓ Espectofluorímetre Perkin Elmer LS 50 B (Massachusetts, EUA)
 - ✓ Centrífuga (Kokusan Corporation, Tòquio, Japó) H-103N
 - ✓ Ultracentrífuga (Kontron Instruments, Zuric, Suïssa) T-1045
 - ✓ Rotor Ultracentrífuga (Kontron Instruments, Zuric, Suïssa) TFT 45,6
 - ✓ Homogeneïtzador Politron PCU (Kinematica, NY, EUA)
 - ✓ Homogeneïtzador Heidolph DIAx 900: (Sigma Chemical CoA., St.Louis, EUA)
 - ✓ Sistema per a la preparació de mostres ABI Prism 6700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA)
-

- ✓ Termociclador Perkin-Elmer 2720 (Massachusetts, EUA)
 - ✓ Termociclador ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, EUA)
 - ✓ ICP-MS Perkin Elan 6000 (Massachusetts, EUA)
 - ✓ Forn Microones Milestone (Itàlia)
 - ✓ Balança analítica (Sartorius AG, Göttingen, Alemanya)
 - ✓ pHimetre (Crison Instruments, SA., Barcelona, Espanya)
-

2. METODOLOGIA

2.1. Grups de tractament

Als 5 mesos d'edat, els animals van ser pesats i es van distribuir en diferents grups de tractament. Durant 6 mesos (període de tractament) van rebre en tot moment aigua de l'aixeta (excepte els grups tractats) i una dieta complementada amb alumini o amb dieta estàndard (Panlab, Barcelona) *ad libitum*.

Els grups de tractament assignats van ser els següents:

Taula 4. Grups de tractament

Nº animals	Tractament	Genotip	
Grup I	19	Control	Tg2576
Grup II	22	Control	Wild
Grup III	21	Alumini	Tg2576
Grup IV	19	Alumini	Wild
Grup V	20	Melatonina	Tg2576
Grup VI	20	Melatonina	Wild
Grup VII	21	Alumini/Melatonina	Tg2576
Grup VIII	22	Alumini/Melatonina	Wild
Grup IX	20	DFO	Tg2576
Grup X	21	DFO	Wild
Grup XI	20	Alumini/DFO	Tg2576
Grup XII	19	Alumini/DFO	Wild

2.2. Preparació i administració del tractament

Els animals dels grups III (Al Tg), IV (Al Wild), VII (Al+Mel Tg), VIII (Al+Mel Wild), XI (Al+DFO Tg) i XII (Al+DFO Wild) van rebre lactat d'alumini a través de la dieta (1 mg d'alumini/g de menjar) (Golub i col·l., 2003).

D'altra banda, els animals dels grups V (Mel Tg), VI (Mel Wild), VII (Al+Mel Tg) i VIII (Al+Mel Wild) van ser tractats amb melatonina a una dosi de 10 mg/kg/dia dins de l'aigua de beguda (Nogués i col·l., 2006). La concentració de melatonina en els biberons es va ajustar en relació al consum d'aigua i el pes dels ratolins. La dissolució

final de melatonina contenia 0,065% d'etanol. L'aigua es va disposar en uns biberons tenyits de negre per protegir al màxim la fotodegradació de la melatonina i es canviava 2 cops a la setmana. Els animals que no rebien melatonina com a tractament també van rebre 0,065% d'etanol a través de l'aigua de beguda.

Per últim, els animals dels grups IX, X, XI i XII van rebre 0,20 mmol DFO/kg/dia mitjançant una injecció subcutània dos cops per setmana.

2.3. Tests d'aprenentatge

a. Camp obert (*Open field*)

Mitjançant la prova de camp obert es poden avaluar diferents paràmetres de l'activitat motora dels animals quan són exposats a un nou ambient. En aquesta prova es valora la distància total recorreguda (activitat horitzontal) i el nombre d'aixecaments realitzats (activitat vertical) en períodes de temps determinats. L'animal es col·loca en el centre del recinte sota la llum que l'il·lumina. A partir d'aquest moment comença l'observació de l'animal durant quinze minuts, durant els quals s'avaluarà la seva activitat horitzontal i vertical. Per a l'anàlisi dels resultats, aquests quinze minuts es divideixen en fraccions de 5 minuts cada un per a la valoració de l'habitució de l'animal al nou ambient. Van realitzar aquesta prova 8 animals per grup de tractament.

b. Laberint d'aigua de Morris (*Water maze*)

Aquest test està dissenyat per valorar l'aprenentatge i la memòria espacial (memòria que depèn de la integritat de l'hipocamp). El laberint d'aigua de Morris és una tasca de navegació en la qual els ratolins han de cercar un objectiu invisible (una plataforma submergida on l'animal pot situar-se i deixar de nedar, però la qual no pot veure) mitjançant l'ús de certs estímuls externs (senyals geomètrics de les parets). Sembla que els animals fan servir un mapa cognitiu com a representació del seu entorn quan resolen aquesta tasca (Morris, 1981).

Per a l'avaluació cognitiva es van fer servir 8 animals de cada grup de tractament. Tres dies abans de passar el test, els animals van ser exposats a l'aigua durant 30 segons, amb la finalitat d'habituar-se al nou ambient. Durant cinc dies consecutius, es va avaluar l'adquisició de la prova, en què cada animal tenia quatre intents o *trials* de 60 segons. En el protocol que es va fer servir, la plataforma no va canviar de lloc en cap dels intents, i l'animal havia de nedar utilitzant sols les referències exteriors. Un cop

trobada la plataforma, l'animal es deixava durant 30 segons sobre la mateixa (per poder situar la plataforma en el seu mapa cognitiu). En cas que l'animal no aconseguís trobar la plataforma submergida durant els 60 segons que durava el *trial*, se'l conduïa fins a la plataforma i se'l deixava allí durant els 30 segons corresponents.

L'últim dia, després de la prova d'adquisició, es va realitzar una prova de retenció. Per a la realització d'aquesta prova, prèviament es va treure la plataforma de la piscina i es va avaluar el temps que l'animal passava nedant dins el quadrant diana i la distància recorreguda en el mateix durant un sol intent o *trial probe* (quadrant virtual que conté la plataforma).

2.4. Sacrifici dels animals i recollida de mostres

Després del període de tractament i un cop finalitzada l'avaluació de la conducta, els animals van ser pesats i anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) i xilazina (10 mg/kg) dissoltes en solució salina (0,9% NaCl). Els animals van ser decapitats i seguidament el cervell va ser disseccionat per a l'obtenció del còrtex, cerebel i hipocamp. La distribució i l'emmagatzematge de les mostres va ser el següent:

- El cerebel, còrtex i hipocamp de 5 animals per grup van ser destinats a la determinació de metalls (alumini, ferro, zinc, manganès i coure). Les mostres es van guardar en tubs d'Eppendorf a -20°C.
- 5 animals per grup van ser destinats a l'avaluació del dany oxidatiu. Es va determinar l'activitat dels enzims antioxidants SOD, CAT i GPx, l'activitat de l'enzim GR i la concentració de GSH i GSSG, així com la concentració de TBARS i les proteïnes totals en els tres teixits (hipocamp, còrtex i cerebel).

Per poder determinar els nivells de peroxidació lipídica i l'activitat enzimàtica dels diferents enzims antioxidants, així com els nivells de GSH/GSSG, en primer lloc es va obtenir la fracció soluble dels teixits cerebrals a estudiar. Per aquest motiu, els diferents teixits cerebrals es van homogeneïtzar amb tampó fosfat sòdic 200 mM a pH 6,25, en una proporció 1/10 pes/volum. L'homogenat resultant va ser centrifugat a 105.000 g durant una hora a 4°C. Les mostres

destinades a la determinació del glutatió van ser precipitades amb àcid tricloroacètic (dilució 1:1,17; 100 µl homogenat més 17,6 µl TCA).

La fracció soluble obtinguda es va al·licuar en tubs d'Eppendorf prèviament rotulats i organitzats per a cada anàlisi i es va congelar a -20 °C.

- 5 animals per grup van ser destinats a l'avaluació de l'expressió de mRNA dels diferents enzims antioxidants i/o relacionats amb el metabolisme del glutatió. Les mostres van ser congelades en nitrogen líquid i guardades en criotubs RNAsa free a -80 °C. Tot el material i els reactius usats durant el procediment eren lliures de RNAses.

2.5. Avaluació de la peroxidació lipídica i dels sistemes antioxidants

2.5.1. Avaluació de la peroxidació lipídica

La peroxidació lipídica és una conseqüència del dany cel·lular molt utilitzada com a marcador de l'estrès oxidatiu. A causa de la descomposició dels àcids grassos poliinsaturats (PUFA) de les membranes biològiques, es genera com a producte final de la reacció d'oxidació una sèrie de compostos, mitjançant la determinació dels quals es pot quantificar la peroxidació generada. En general, els derivats de la lipoperoxidació es poden determinar mitjançant la tècnica de l'àcid tiobarbitúric, per aquesta raó se'ls coneix com a TBARS (substàncies que reaccionen amb l'àcid tiobarbitúric).

Per a l'obtenció dels nivells de peroxidació lipídica, es van determinar els nmol de TBARS per mg de proteïna. Els TBARS es van determinar amb el mètode de Beuge i Aust (1978), però mesurat amb fluorescència en un espectrofluorímetre a 515 nm de longitud d'ona d'extinció i 548 nm de longitud d'ona d'emissió, segons descriuen Richard i col·l. (1992).

En primer lloc es van diluir les mostres perquè els seus valors entressin dintre del rang de linealitat de la recta de calibratge. Totes les mostres es van diluir amb sèrum fisiològic. Posteriorment, les mostres es van barrejar amb 2 ml d'una solució TCA-TBA-HCl (àcid tricloroacètic al 15%, àcid tiobarbitúric al 0,375% i àcid clorhídric 0,25 N) i es van posar al bany a 100 °C durant 15 minuts (el TBA és el responsable de la formació del cromogen de la reacció per la determinació dels TBARS). Passat aquest temps, les

reaccions es van refredar amb gel. Posteriorment, es van centrifugar a 1.900 g durant 10 minuts a 4 °C i el sobrenedant es va passar a les cubetes per fer-ne la lectura de fluorescència.

Per a l'obtenció de la concentració de TBARS a les mostres, es va fer una recta de calibratge, usant com a estàndard el bis-dietilacetal malonaldehid ($d=0,92$ kg/l) a diferents concentracions. La peroxidació lipídica va ser expressada com a nmols de TBARS per mg de proteïna.

2.5.2. Determinació del glutatió

El glutatió és un tripèptid d'àcid glutàmic, cisteïna i glicina i una de les molècules antioxidants més importants. Té funcions com a reductor intracel·lular i protegeix les cèl·lules davant dels radicals lliures, espècies reactives de l'oxigen i compostos tòxics d'origen endogen i exogen. El glutatió reduït (GSH) es manté en un cicle redox amb el glutatió oxidat (GSSG).

1. Glutatió reduït (GSH)

El GSH reacciona amb l'O-phtalaldehid (OPT) a un pH de 8, fet que s'aprofita mitjançant l'ús de tampons bàsics per mesurar l'emissió de fluorescència per part de l'OPT segons el mètode de Hissin i Hilf (1976).

En primer lloc, la fracció soluble va ser diluïda a 1:5 amb tampó fosfat sòdic 100 mM pH 8, EDTA 5 mM: 40 μ l de fracció soluble amb 160 μ l de tampó fosfat sòdic. Es va fer una segona dilució, en aquest cas 1:20, a la cubeta de reacció: 100 μ l de la fracció soluble diluïda amb 1,8 μ l de tampó fosfat sòdic. A continuació s'hi van afegir 100 μ l d'OPT i es va incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.

La lectura es va fer en un fluorímetre a una longitud d'ona de 350 nm d'extinció i una longitud d'ona de 420 nm d'emissió. Per a l'obtenció dels resultats es va realitzar una recta patró amb diverses concentracions conegudes de GSH diluït amb tampó fosfat sòdic. Els resultats s'expressen com a nmols de GSH/mg de proteïna.

2. Glutatió oxidat (GSSG)

La mesura del GSSG es va dur a terme seguint el mètode de Hissin i Hilf (1976), ja que el GSSG també reacciona amb l'OPT i dona fluorescència a un pH 12. Per evitar que el GSH es transformés en GSSG i ens interferís la lectura, la fracció soluble va ser incubada durant 25 minuts amb N-etil-maleïmida, que impedeix l'oxidació.

La fracció soluble es va diluir 1:5 amb solució NEM (25mg NEM dissolts en 5 ml d'aigua destil·lada): 40 µl de teixit homogenat amb 160 µl de solució NEM. Les mostres es van deixar durant 20-30 minuts a temperatura ambient i posteriorment s'hi van afegir 100 µl de tampó NaOH 0,1 N. Es va fer una segona dilució, en aquest cas 1:20, a la cubeta de reacció: 100 µl de la fracció soluble diluïda amb 1,8 µl de tampó NaOH 0,1 N. A continuació, s'hi van afegir 100 µl d'OPT i es va incubar durant 15 minuts a temperatura ambient.

La lectura es va fer en un fluorímetre a una longitud d'ona de 350 nm d'extinció i una longitud d'ona de 420 nm d'emissió. Per a l'obtenció dels resultats es va realitzar una recta patró amb diverses concentracions conegudes de GSSG diluït amb NaOH 0,1 N. Els resultats s'expressen com a nmols de GSSG/mg de proteïna.

2.5.3. Determinació dels antioxidants enzimàtics

Determinació de l'activitat enzimàtica de la CAT

L'activitat de la CAT es va mesurar pel mètode de Cohen i col·l. (1970) mitjançant lectura espectrofotomètrica.

Amb els 150 µl de fracció soluble guardats per a cada un dels teixits a analitzar es va fer una dilució 1:2,33 amb tampó fosfat potàssic ($\text{PO}_4\text{HK}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 100 mM, pH 7.5: 150 µl mostra + 200 µl Tampó fosfat potàssic. Per a la lectura afegim a la cubeta de reacció 833 µl de tampó de peròxid d'hidrogen (H_2O_2 19 mM amb tampó fosfat potàssic ($\text{PO}_4\text{HK}_2\text{-PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 100 mM, pH 7.5) amb 166 µl de la mostra diluïda.

Es determina el grau de desaparició del H_2O_2 per part de la CAT en els primers 30 segons mitjançant la lectura de l'absorbància a una longitud d'ona de 240 nm. Els resultats s'expressen en µmol de H_2O_2 transformats/min/mg proteïna.

Determinació de l'activitat enzimàtica de la SOD

Es va determinar l'activitat enzimàtica de la CuZn-SOD mitjançant espectrofotometria d'absorció segons el mètode de Misra i Fridovich (1972), basat en l'autooxidació de l'epinefrina.

La SOD neutralitza els radicals $O_2^{\cdot-}$ i els converteix en H_2O_2 . L'epinefrina a pH alcalí s'oxida produint $O_2^{\cdot-}$. Aquests radicals formats autooxiden l'epinefrina amb la consegüent formació de l'adenocrom. En presència de la SOD, l'autooxidació de l'epinefrina és inhibida, en transformar els $O_2^{\cdot-}$ formats a H_2O_2 i O_2 i disminuir així la formació de l'adenocrom.

L'activitat enzimàtica de la SOD es va valorar a partir de la corba d'inhibició de la formació d'adenocrom per la presència de diferents concentracions de mostra, determinant la dilució de la mostra que inhibeix el 50% de la formació de l'adenocrom. Per avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina, la lectura es fa cada 40 segons i durant 23 minuts a 30 °C en l'espectrofotòmetre a 480 nm.

En primer lloc, es van fer les dilucions apropiades de la fracció soluble per tal de trobar la concentració que inhibeix el 50 % de la formació de l'adenocrom. Així, es van barrejar 2,5 ml de tampó Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 50 mM, pH 10,2 EDTA 0,1 mM amb 290 μ l d'aigua bidestil·lada i 200 μ l d'epinefrina 6 mM en HCl 1 mM en els pertinents μ l de mostra segons la dilució a fer. En total es van fer 5 dilucions.

Per avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina, es va procedir a realitzar la lectura de l'absorbància de les 5 dilucions de la fracció soluble, d'una solució d'epinefrina (2,5 ml de tampó Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 50 mM, pH 10,2 EDTA 0,1 mM amb 300 μ l d'aigua bidestil·lada i 200 μ l d'epinefrina 6 mM en HCl 1 mM) i del corresponent blanc.

Per a l'obtenció dels resultats es va calcular l'increment de la pendent de reacció de cada dilució, i s'obtingué el % d'activitat per a cadascuna. A partir d'aquests resultats es va realitzar una recta logarítmica/lineal (% activitat / mg proteïna total) a partir de la qual varem obtenir els mg de proteïna que inhibeixen el 50% de la formació de l'adenocrom. A partir d'aquest valor es va calcular l'activitat de la SOD. El resultat s'expressa en U/mg de proteïna, en què una unitat és la quantitat equivalent de

proteïna que inhibeix en un 50% la transformació de l'epinefrina en adenocrom a pH alcalí.

Determinació de l'activitat enzimàtica de la GPx

La GPx junt amb la intervenció del GSH, catalitza la reducció del H_2O_2 i dels hidroperòxids tal i com es mostra a la figura (**fig. 10**). Aquesta reacció es troba en equilibri amb la reacció de la GR, enzim dependent de la nicotinamida adenín dinucleòtid fosfat (NADPH) que redueix el GSSG a GSH.

Per determinar l'activitat de la GPx es va seguir el mètode descrit per Wheeler i col·l. (1990). El fonament d'aquesta tècnica és mesurar la disminució del NADPH conforme es van reduint els hidroperòxids mitjançant la seva lectura d'absorbància a 340 nm durant 2 minuts (el NADPH, igual que el $NADP^+$, absorbeix la radiació electromagnètica en l'espectre de la llum ultraviolada a causa de la presència de la base adenina).

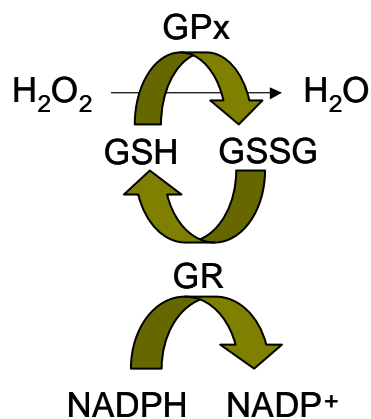


Figura 10. Reacció de GPx i GR

En primer lloc, es van barrejar 54 μ l de la fracció soluble prèviament diluïts i es van barrejar amb 135 μ l del reactiu de treball (3,7 ml tampó fosfat potàssic 100 mM EDTA 1 mM pH 7, 0,5 ml NADPH 2,25 mM, 0,1 ml de GR diluïda 1:2,5 en el tampó fosfat potàssic). Aquesta barreja va ser incubada durant 5 minuts a 37 °C. Posteriorment, s'hi van afegir 36 μ l de T-butilhidroperòxid (T-buOOH) 15 mM diluït 1:2.

Mitjançant la lectura d'absorbància del NADPH a 340 nm i considerant un coeficient d'extinció molar (ϵ) de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, es va obtenir l'activitat de la GPx. Els resultats es van expressar en mU/mg de proteïna.

Determinació de l'activitat enzimàtica de la GR

Per determinar l'activitat de la GR també es va seguir el mètode descrit per Wheeler i col·l. (1990). En aquest cas, es va veure la formació del NADP⁺ a partir del NADPH durant la reducció del GSSG.

Es van barrejar 40 µl de la fracció soluble prèviament diluïts amb 356 µl del tampó fosfat potàssic (0,25 mM, EDTA 2 mM pH 7,4) i amb 20 µl de NADPH (2 mM).

Mitjançant la lectura de l'augment de l'absorbància del NADP⁺ a 340 nm es va obtenir l'activitat de la GR. Els resultats es van expressar en mU/mg de proteïna.

2.5.4. Determinació de la concentració de proteïnes totals

La concentració de proteïnes es mesura mitjançant el reactiu de Bradford (Bradford, 1976). El mètode es basa en la formació d'un complex entre les proteïnes i el colorant Brilliant Blue G. Aquest complex fa que l'absorció màxima del reactiu passi de 165 nm a 595 nm. L'absorbància és proporcional a la quantitat de proteïna present a la mostra.

Es van barrejar 50 µl de la fracció soluble amb 1,5 ml del reactiu de Bradford. Aquesta barreja es va incubar durant 5 minuts a temperatura ambient i es va llegir l'absorbància de la mostra a l'espectrofotòmetre a 595 nm.

Per a l'obtenció de la concentració de proteïna present en la mostra es va realitzar una recta patró utilitzant com a estàndard l'albumina sèrica bovina (BSA) a diferents concentracions conegudes. Mitjançant aquesta recta patró es va determinar la concentració de la mostra. Els resultats es van expressar en mg proteïna/g de teixit.

2.6. Avaluació de l'expressió de l'mRNA dels enzims antioxidants

2.6.1. Extracció de l'RNA

Per a l'extracció de l'RNA total, es van afegir un màxim de 100 mg del teixit escollit (hipocamp, cerebel o còrtex) dins d'Eppendorf d'1,5 ml prèviament retolats, i s'hi van afegir 325 µl de solució de lisi. A continuació s'hi van afegir 325 µl de solució PBS i els tubs es varen mesclar per inversió fins a l'homogeneïtzació de les dues fases. Les mostres es van homogeneïtzar durant 30 segons i es van guardar a la nevera durant 1 hora.

L'extracció de l'RNA es va dur a terme amb l'aparell ABI Prism 6700 a partir d'una sèrie de rentats. Es van utilitzar 200 µl de l'homogenat per al còrtex i cerebel i 100 µl d'homogenat en el cas de l'hipocamp. L'RNA extret es va guardar al congelador de -80°C.

2.6.2. Transcripció inversa

Per a l'obtenció de cDNA a partir de l'RNA total extret, es va procedir a la realització d'una RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction).

Es va procedir a la transcripció inversa de l'RNA extret per a cada una de les mostres, a partir d'1 µg/µl d'RNA total de cada una d'elles. En primer lloc, les mostres es van deixar descongelar lentament sobre gel. Posteriorment, es van barrejar els µl d'RNA necessaris amb aigua RNasa free fins a un volum total de 25 µl. S'hi van afegir 25 µl de la RT Master Mix (per a 1 mostra: 8 µl d'aigua lliure de nucleases, 5 µl de tampó RT 10X, 2,5 µl d'inhibidor d'RNasa, 2 µl de dNTP Mix 25X, 5 µl d'RT Random Primers 10X i 2,5 µl AMV) i es van introduir al termociclador Perkin-Elmer 2720 (25 °C/10 min, 37 °C/2 h, 85 °C/5 segons, 4 °C/∞) on es va procedir a realitzar la transcripció inversa.

El cDNA obtingut es va guardar al congelador a -20°C fins al seu ús.

2.6.3. Real Time PCR

Per a cada mostra de teixit i grup de tractament es va quantificar l'expressió gènica dels enzims Cu-ZnSOD (SOD1, citosòlica), CAT i GR.

La PCR a temps real és una tècnica que permet amplificar i detectar a la vegada la quantitat de mRNA que s'expressa mitjançant la mesura d'emissió de fluorescència, gràcies a l'ús de sondes d'hidròlisi o sondes Taqman. Aquestes sondes s'uneixen a llocs específics del cDNA, exactament entre les zones d'unió dels primers *forward* i *reverse*. Contenen un colorant *reporter* que s'allibera de la Taq polimerasa durant el pas d'amplificació del cDNA. Quan l'enzim polimerasa topa amb la sonda, s'elimina el *reporter* (6-FAM), emetent fluorescència de forma proporcional a la quantitat de producte acumulat.

Es va fer una quantificació relativa mitjançant el mètode dels Ct comparatius. En la quantificació relativa, s'utilitzen fórmules aritmètiques per calcular els Ct o cicles en què la fluorescència és màxima. Aquest mètode ens permet quantificar sempre en comparació a una mostra/es de referència. En el nostre cas, varem escollir com a calibradors els grups control Tg i control *wild* per a als grups Tg i *wild* corresponents. Com a control endogen es va usar un RNA present en totes les mostres: el 18SRNA. Aquest control ens va permetre normalitzar la quantificació de les mostres.

En primer lloc, es van preparar els *pools* per a cada una de les mostres: (2 µl cDNA + 2,5 µl H₂O). De cada un d'aquests *pools*, es van al·liquotar en una placa microtiter de 90 pouets 4,5 µl de cada mostra per triplicat i per cada un dels gens a quantificar (SOD, CAT, GR, 18S). Es van analitzar 7 mostres per placa. A continuació es va preparar el *pool* per a cada un dels gens a analitzar (60 µl de Fast MasterMix 2X + 6 µl de Taqman Assay 20X) i es van afegir 5,5 µl a cada pouet i a dos pouets extra per gen com a control negatiu. A continuació es va procedir a realitzar la PCR a temps real en el termociclador ABI7700 d'Applied Biosistems.

Els resultats per a cada mostra es van expressar segons l'equació:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

En què $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{mostra}} - Ct_{\text{c.endogen}})_{\text{grup tractat}} - (Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{\text{c.endogen}})_{\text{grup control}}$

2.7. Determinació dels nivells d'alumini en el teixit cerebral

Per determinar els nivells d'alumini en els diferents grups de tractament, es van processar mostres d'hipocamp, cerebel i còrtex mitjançant espectrofotometria atòmica d'inducció de plasma acoblat (ICP-MS).

Aquesta tècnica es basa en la vaporització, dissociació i ionització dels elements químics de la mostra a l'interior d'un plasma (gas neutre parcialment ionitzat: argó (Ar)). Els ions positius formats se separen en funció de la seva relació massa/càrrega i són detectats per un sistema multiplicador d'electrons que permet detectar els ions de forma individual. Prèviament a l'anàlisi, les mostres es van digerir amb àcid nítric (HNO₃) suprapur per a l'obtenció dels metalls presents en les mateixes.

El mateix dia de la digestió, les mostres es van pesar directament en *microinserts* de quars i es van digerir amb 0,5ml de HNO₃ suprapur. Els *microinserts* es van introduir en recipients de tefló, en els quals es va dur a terme la digestió. Les mostres van ser digerides en un forn microones durant 30 minuts a 185 °C i 1000W, segons les normes del fabricant. A continuació, els digerits es van enrasar a 5 ml amb H₂O mili-Q i es van guardar al congelador.

Abans de procedir a la digestió, tot el material va ser meticulosament netejat. La neteja del material es va realitzar, en primer lloc, amb un rentat amb aigua destil·lada i una posterior d'aigua mili-Q. A continuació, el material es va netejar amb àcid nítric suprapur (HNO₃) al 10% durant un període de 12 hores, i posteriorment amb aigua mili-Q per evitar al màxim la contaminació de les mostres.

La fiabilitat de la tècnica es va provar mitjançant l'ús d'una referència estàndard de cervell de rata preparada als nostres laboratoris, així com mitjançant l'ús d'un patró internacional de referència de la NIST (NIST material de referència 1577b, fetge boví) a cada assaig.

RESULTATS

RESULTATS PUBLICATS

1. Aluminum exposure through the diet: Metal levels in A β PP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease

Authors: Mercedes Gómez, José L.Esparza, María Cabré, Tania Garcia, Jose L.Domingo

Toxicology (2008); 249(2-3): 214-219

L'alumini (Al), el ferro (Fe), el coure (Cu), i el zinc (Zn) s'han relacionat amb l'etiologia de certes malalties neurodegeneratives. A més, aquests elements causen canvis conformacionals de la proteïna β -amiloide implicada en la malaltia d'Alzheimer. En aquest estudi es van determinar les concentracions d'Al, Cu, Zn, Fe i Mn en varis teixits de ratolins Tg2576 (transgènics A β PP) tractats amb lactat d'alumini. Les femelles Tg2576 i de soca salvatge (*wild-type*) van ser exposades a través de la dieta a 1 mg Al/g menjar durant 6 mesos. Als 11 mesos d'edat es van mesurar les concentracions dels metalls en diversos teixits. En el cervell, els nivells d'Al trobats van ser majors en l'hipocamp que en el còrtex i el cerebel. En l'hipocamp, les concentracions de Cu van disminuir en els ratolins Tg2576 controls mentre que els nivells de Zn van ser majors en els ratolins tractats amb Al. Les concentracions de Cu, Zn, Mn, i Fe trobades en el fetge, ronyons i ós no es van trobar afectades per l'exposició a Al. Aquests resultats mostren que l'exposició a Al dels ratolins Tg2576 i *wild* no va produir cap canvi significatiu en els metalls en relació amb el genotip, donant una resposta similar en ambdós grups d'animals. Tenint en compte que els ratolins Tg2576 han estat considerats un potent model animal per a la malaltia d'Alzheimer, aquests resultats no donen suport a la possible relació entre l'Al i l'etiologia d'Alzheimer.

Paraules clau: Alumini, exposició dietètica, coure, zinc, manganès, ferro, ratolins transgènics A β PP.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol



Aluminum exposure through the diet: Metal levels in A β PP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease

Mercedes Gómez^{a,b}, José L. Esparza^a, María Cabré^b, Tania García^{a,b}, José L. Domingo^{a,*}

^a Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, "Rovira i Virgili University", Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain

^b Biochemical Unit, "Rovira i Virgili University", Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2008

Received in revised form 9 May 2008

Accepted 9 May 2008

Available online 17 May 2008

Keywords:

Aluminum

Dietary exposure

Copper

Zinc

Manganese

Iron

A β PP transgenic mice

ABSTRACT

Aluminum (Al), iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) cause have been implicated in the etiology of certain neurodegenerative disorders. Moreover, these elements cause the conformational changes of Alzheimer's amyloid β protein. In this study, we determined the concentrations of Al, Cu, Zn, Fe, and Mn in various tissues of Tg 2576 (A β PP transgenic) Al-treated mice. Female Tg 2576 mice and wild-type littermates were exposed through the diet to 1 mg Al/g for 6 months. At 11 months of age, metal concentrations were measured in various tissues. In brain, Al levels were higher in hippocampus than in cortex and cerebellum. In hippocampus, Cu concentrations decreased in non-treated Tg 2576 mice, while Zn levels were higher in Al-treated mice. Copper, Zn, Mn and Fe concentrations in liver, kidney and bone were not affected by Al exposure. The current results show that Al exposure of Tg 2576 and wild-type mice did not produce important metal changes related with the genotype, responding similarly both groups of animals. As Tg 2576 mice have been considered as a potential model for Alzheimer's disease (AD), the present results would not support the hypothetical role of Al in the etiology of AD.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aluminum (Al) is an abundant element in the environment, which has a considerable number of uses and industrial applications. Although human exposure to this metal may occur from the environment, and through the diet/drinking water and the consumption of certain medications. Al content in food and water, and Al inhalation as fine particles, are the most relevant ways of exposure. The average human Al intake through food and beverages (excluding drinking water) has been reported to be in the range 2.5–13 mg/day. However, it varies with food composition, country/place of residence, age and sex (WHO/IPCS, 1997). Although Al bioavailability from water is higher than that from food (0.3% vs. 0.1%, respectively), due to notable differences in daily Al intake, drinking water contributes considerably less to total Al body burden (Yokel and Florence, 2006).

It is well established that Al is a neurotoxic agent. Various mechanisms have been proposed for Al-induced neurotoxicity, including free radical damage via enhanced lipid peroxidation, impaired glucose metabolism, effects on signal transduction and protein modification, alterations on the axonal transport, and alteration of

phosphorylation levels of neurofilaments (Strong, 1994; Esparza et al., 2003, 2005; Exley, 2004; Gómez et al., 2005; Kawahara, 2005; Shcherbatykh and Carpenter, 2007; Walton, 2007). However, the link of Al to the etiology of various serious neurological disorders such as Alzheimer's disease (AD) remains still unclear (McLachlan et al., 1989, 1991; Yokel, 2000; Exley, 2004; Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005). In spite of this uncertainty, a number of epidemiological reports concerning Al exposure from drinking water and the risks of AD are available from the scientific literature (Flaten, 2001; Exley and Esiri, 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007; Walton, 2007).

Alzheimer's disease, the most common cause of dementia in humans, is a progressive neurodegenerative disorder that gradually deprives the patient of cognitive function. AD is mainly characterized by the presence of neuritic plaques (senile plaques) and neurofibrillary tangles (NTF) in the hippocampus and neocortex of the brain (Domingo, 2006; Yokel, 2006; Yokel and Florence, 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007). Although most AD cases occur randomly, about 5% of cases appear to be genetic. AD prevalence rates vary by sex, ethnicity, and geographic region, suggesting an important modulating role for environmental factors (Maynard et al., 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007). In addition to age and female sex, a number of risk factors have been associated with the potential development of AD. Some metals, especially Al, copper (Cu), iron (Fe) and zinc (Zn), have been included among commonly

* Corresponding author. Tel.: +34 977 759380; fax: +34 977 759322.

E-mail address: joseluis.domingo@urv.cat (J.L. Domingo).

suggested risk factors (Domingo, 2006; Yokel, 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007).

In recent years, there has been a notable interest on the role of Cu, Fe, manganese (Mn), and other redox-active transition metals in the neuropathology of AD (Huang et al., 2004; Kawahara, 2005; Maynard et al., 2006). Copper and Fe are redox active elements that may play important catalytic roles in various enzymes (Kowalik-Jankowska et al., 2002; Maynard et al., 2002). However, these redox active metals can also mediate the formation of reactive oxygen species (ROS), having potential adverse consequences (Kowalik-Jankowska et al., 2002; Maynard et al., 2002, 2005, 2006; Bush, 2003; Kawahara, 2005).

Recently, Religa et al. (2006) suggested that Zn accumulation might be the factor primarily responsible for development of neural changes leading dementia. In turn, Mn another essential element required by mammals for certain physiological functions, has been also implicated in the etiology of certain neurological disorders (Takeda, 2003; Colomina et al., 2005; Torrente et al., 2005; Milatovic et al., 2007; Perl and Olanow, 2007). It can cause a parkinsonism-like syndrome known as manganism, which initially entails apathy, anorexia, insomnia, extreme fatigability, somnolence and a labile mood (Yokel, 2006). Elevated Mn levels have also been found in AD brain (Rao et al., 1999). On the other hand, Al and Mn have been also implicated in oxidative damage (Takeda, 2003; Maynard et al., 2005; Perl and Olanow, 2007). Manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) is a major defense mechanism against potential cellular damage by ROS. The results of a number of recent studies suggest the importance of transition metals in AD. Copper, Zn and Fe accumulated in and around amyloid plaques in the AD brain, where their levels were three-to-five higher than those of age matched controls (Atwood et al., 1999; Maynard et al., 2002, 2005; Bush, 2003; Shcherbatykh and Carpenter, 2007). Experimental evidence and clinical data suggest that brain biometal dysregulation and possible environmental metal exposure contribute to AD pathogenesis (Liu et al., 2006).

There are currently several genetically engineered AD mouse models. The amyloid precursor protein (A β PP) (SW) Tg 2576 transgenic mouse is an animal that express high levels of the mutant amyloid-peptide (A β), having a phenotype characterized by memory deficits after 9–10 months of life. This mouse is currently considered as an experimental model of AD (Hsiao et al., 1996; Frautschy et al., 1998; Chapman et al., 1999; Pratico et al., 2002a; Rodrigo et al., 2004; Maynard et al., 2006; López-Toledano and Shelanski, 2007). Nowadays, information about concentrations of the above indicated metals in cerebral and other tissues in that animal model is very scarce. Consequently, the aim of this study was to evaluate metals variation using an AD mouse model. The concentrations of Al and other metals hypothetically implicated in certain neurodegenerative diseases, were determined in cerebral regions, as well as in liver, bone and kidney of Tg 2576 mice (A β PP transgenic mice), following chronic dietary exposure to Al, a well-known neurotoxic agent.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, animals and treatment

Aluminum was administered through the diet as Al lactate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Regular chow was supplemented with 1 mg of Al/g of chow (Harlan, Barcelona, Spain). It is important to note that due to an error in vendor calculation, the Al content in chow was only 370 μ g of Al/g of diet instead of 1 mg/g as ordered to the manufacturer. In tap water, on average, the following concentrations were found: chlorides, 148 mg/l; fluorides, 0.28 mg/l; Al, 14 μ g/l; and SiO₂, 7.5 mg/l. Reagents used were of the highest quality available and obtained from commercial sources.

A β PP transgenic mice were bred from a breeding pair of Tg 2576 mice (Taconic Europe, Ejby, Denmark). An authorization from Taconic Europe was obtained to do

the cross-breeding. The Tg 2576 colony was maintained by crossing Tg 2576 males with C57BL6/SJL (wild-type) F1 females. At 2 months of age, the transgene status was determined by PCR of tail DNA. Female animals were then separated into transgenic and wild-type. Only females were used because of the aggressive behavior among male results in frequent injuries. Animals (15–20 g) were housed in a room equipped with automatic light cycles (12 h light/dark), and maintained at 22 \pm 2 °C and relative humidity of 40–60%. Food and tap water were offered *ad libitum* throughout the study. The procedures used in the study were approved by the Ethics Committee of Animal Research, "Rovira i Virgili" University (Tarragona, Spain).

At 5 months of age, treatment was initiated. One group of animals (control group) received regular chow and tap water. A second group of mice was given Al lactate supplemented in the diet (1 mg of Al/g diet) (Al group) (Golub et al., 2003) and tap water. The study was carried out with Tg 2576 mice and wild-type littermates. Fresh diets were replaced twice per week and continued until the end of the study at 11 months of age. Food consumption was measured during the first month of treatment. No differences between control and treated animals were found (data not shown). At the end of the experimental period, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) dissolved in 0.9% saline. Subsequently, animals were decapitated and brains were removed. Samples of liver, bone, kidney and brain were collected. Brains were placed on an ice-cold plate, and cortex, cerebellum and hippocampus were dissected.

2.2. Metal analysis

Tissue samples were weighed in a microsampling quartz insert and 65% nitric acid (Supapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) was added to digest the sample. The microsampling inserts were then introduced in Teflon vessels. The vessels were putting into a microwave oven Star D (Milestone, Sorisole, Italy) during 30 min at 185 °C and 1000 W according to the manufacturer's instructions. The digested was diluted at 5 ml with milli-Q water. All materials were previously washed with 10% nitric acid in order to avoid possible sample contamination. For quality control, brain, liver, bone and kidney reference standards (prepared in-house) and NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA) were measured in each assay. Aluminum, Fe, Mn, Cu, and Zn concentrations were determined by means of a computer-controlled sequential inductively coupled plasma spectrometer (PerkinElmer Elan 600) according to DIN EN ISO 17294-2. Detection limits were the following: 1.00 μ g/kg for Al, 0.010 μ g/g for Fe, 0.10 μ g/kg for Mn and Cu, and 0.020 μ g/g for Zn.

2.3. Statistics

Statistical analysis was performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). To evaluate the homogeneity of variances, the Levene test was used. When variances of different treatment groups were homogeneous, ANOVA, and subsequently Scheffè paired comparisons (as a post hoc test) were applied in order to determine the level of significance between groups. If the variances were not homogeneous, Kruskal–Wallis test and the Mann–Whitney *U*-test were used. To compare the means of samples of a same genotype, Student's *t*-test was performed. Results are given as mean values \pm standard deviations (S.D.). For all tests, the level of statistical significance was established at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. General effects

There were no deaths during the experimental period. Animals exposed to Al did not show any differences in body weight gain when compared with the respective control groups. No significant differences were noted in the weight of the whole brain in mice of any Al-treated group in comparison with control mice (data not shown). We estimated that Tg 2576 Al-treated mice ingested 3.68 g of food per day, while wild-type consumed 3.70 g per day. Therefore, Al intake was about 1365 μ g Al/day/mouse (or about 54 mg Al/kg/day). In turn, control Tg 2576 mice ingested 3.54 g of diet and control wild-type 3.62 g/day. Therefore, the amount of Al ingested would be about 79 μ g Al/day/mouse (or about 3.41 mg Al/kg/day).

3.2. Differences in metal concentrations between wild-type and Tg 2576 mice not exposed to aluminum

To determine how metal concentrations could vary depending on the genetic background, they were compared in three brain

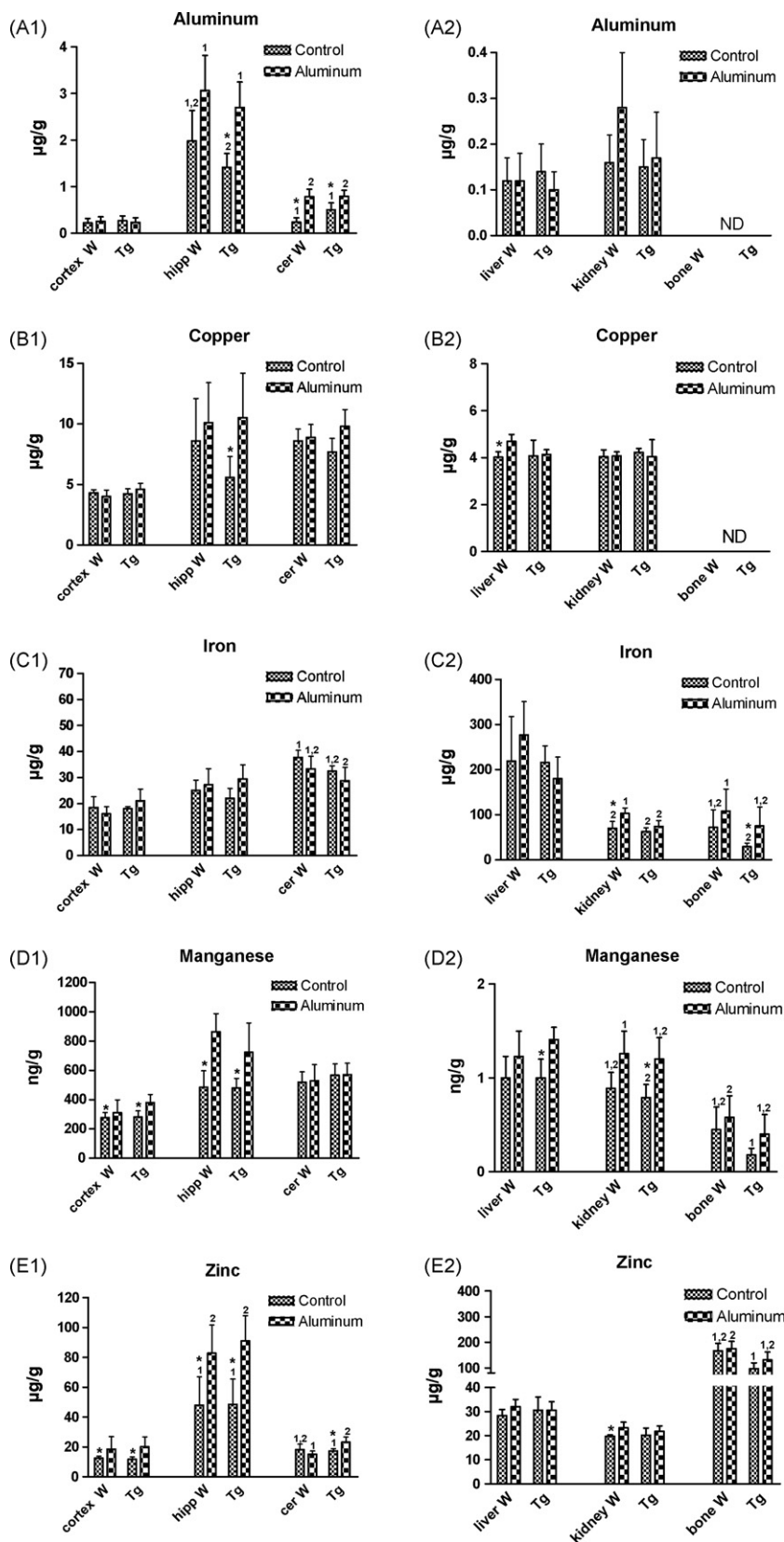


Fig. 1. Levels (mean \pm S.D.) of (A) aluminum, (B) copper, (C) iron, (D) manganese and (E) zinc in (1) cortex, (1) hippocampus (hipp), (1) cerebellum (cer), (2) liver, kidney and bone of wild-type (W) and Tg 2576 (Tg) mice exposed to 1 mg Al/g of food for 6 months. Different superscripts on the bars (1 and 2) indicate significant differences between groups. An asterisk (*) indicates a significant difference ($P < 0.05$) in the groups of a same genotype. (ND) not detected. $N = 6$.

regions (cortex, hippocampus and cerebellum), as well as in liver, kidney and bone of control wild-type and control Tg 2576 mice. At the end of the experimental period (11 months of age), animals did not show significant differences in Al, Cu, Fe, Mn and Zn levels (Fig. 1A1–E1) in the brain regions analyzed. A slight decrease in Al (Fig. 1A1) and Cu (Fig. 1B1) levels were detected in hippocampus of Tg 2576 animals, while an increased concentrations of Al was noted in cerebellum of Tg 2576 mice (Fig. 1B1). Iron concentrations also decreased in cerebellum of Tg 2576 mice when compared with the respective wild-type controls (Fig. 1C1). The remaining analyzed metals did not show any significant change in their respective levels.

Metal concentrations in the remaining tissues did not show significant differences between genotypes. However, it is worthy to note that the levels of Fe, Mn and Zn were slightly lower in bone (Fig. 1C2–E2), whereas in this tissue Al (Fig. 1A2) and Cu (Fig. 1B2) could not be detected in none of the control groups, being all levels under the respective detection limits.

3.3. Differences in metal concentrations between Al-exposed wild-type and Tg 2576 mice

A group of animals of each genotype was orally exposed to Al (1 mg/g) for 6 months and sacrificed at 11 months of age. In brain, the highest Al levels were found in hippocampus, followed by those in cerebellum and cortex (Fig. 1A1). Exposure of the genotypes to this metal did not cause significant differences in Al concentration in any of the brain regions. Iron levels decreased in cerebellum of Tg 2576 mice (Fig. 1C1), while the concentrations of Zn (Fig. 1E1) significantly increased in cerebellum of the same genotype. In turn, Cu (Fig. 1B1) and Mn (Fig. 1D1) levels did not show significant differences. With respect to the remaining analyzed tissues, higher Al levels were detected in kidney of animals of the wild-type genotype, in which the main highest Al concentration was found. However, no significant differences were observed when these animals were compared with the homonymous Tg 2576 exposed group (Fig. 1A2). The levels of Cu (Fig. 1B2) were similar in liver and kidney, whereas Fe (Fig. 1C2) concentrations were higher in livers of wild-type animals than in those of Tg 2576 mice. Iron levels also increased in bone and kidney of the wild-type exposed groups (Fig. 1C2). In turn, an increase in Mn concentrations was seen in the liver of Tg 2576 mice and the bone of wild-type animals (Fig. 1D2). With respect to Zn, lower levels were observed in bone of Tg 2576 mice (Fig. 1E2), while the levels of Al and Cu in that tissue were under the limits of detection.

3.4. Differences in metal concentrations between groups of same genotype, exposed/non-exposed to Al

In general terms, in the presence of Al and independently of the genotype, all metal levels were increased, mainly in hippocampus. However, in most cases the increases did not reach the level of statistical significance. Aluminum concentrations were significantly enhanced in hippocampus and cerebellum of Tg 2576 mice and wild-type groups, while the differences did not reach the level of significance in the cortex (Fig. 1A1). A significant increase of Cu in hippocampus, as well as a slight increased trend was observed in cerebellum of Tg 2576 mice (Fig. 1B1). Although Fe levels increased in hippocampus of Tg 2576 mice, again the differences were not statistically significant. A decrease of Fe concentrations was observed in cerebellum of all Al-treated groups (Fig. 1C1). Manganese and Zn levels increased in cortex and hippocampus of wild-type and Tg 2576 mice (Fig. 1D1, E1), while cerebellum of Tg 2576 mice also showed a significant increase in Zn levels (Fig. 1E1).

With respect to the remaining tissues, no statistically significant differences in Al levels were observed in kidney of Tg 2576 and wild-type mice (Fig. 1A2). As commented above, the levels of Al and Cu were not detected in bone, whereas Cu concentrations significantly increased in the liver of wild-type mice (Fig. 1B2). The liver of Al-treated wild-type mice showed a slight increase in Fe levels (Fig. 1C2). The concentration of this metal increased significantly in kidney of same genotype (Fig. 1C2). Iron showed an increased trend in bone of exposed wild-type mice and a significant increase in the same tissue of treated Tg 2576 animals (Fig. 1C2). Although the levels of Mn increased in all tissues of wild-type mice, and in bone of Tg 2576 animals, the differences did not reach the level of statistical significance. By contrast, the increased levels of Mn in liver and kidney of Tg 2576 were statistically significant (Fig. 1D2). Finally, Zn levels increased significantly only in the kidney of Al-treated wild-type animals.

4. Discussion

There is not doubt with respect to the enormous importance and concern of AD in our modern societies, as well as the lack of a clear and sufficient scientific knowledge of many aspects of this serious neurological disorder. In order to increase the available information, in this study we have assessed the influence of chronic dietary Al exposure, an element hypothetically involved in some step of the etiology of AD, on the accumulation and distribution of Al and other trace elements in brain and various tissues of Tg 2576 female mice, a potential model of AD. To the best of our knowledge, this is the first time that Al is determined in tissues of A β PP transgenic animals.

Metals such as Al, Fe, Cu and Zn have been included among the potential risk factors for the etiology of AD. Although the mechanisms by which these metals might hypothetical exert their role in AD remains still unclear. It has been suggested that metal ions could contribute to an early step of amyloidogenesis by promoting the initial aggregation of A β (Maynard et al., 2002; Bush, 2003; Kawahara, 2005; Domingo, 2006). The brain is a specialized organ that normally concentrates Cu, Fe and Zn in the neocortex (Lovell et al., 1998; Liu et al., 2006). It is well established that the age is the dominant risk factor in certain neurodegenerative diseases such as AD. An age-related increase of cerebral Al, Cu, Fe and Zn levels has been reported, but this is not sufficiently clear for Mn (Morita et al., 1994; Bartzokis et al., 1997; Yokel, 2006). A relationship between Al and the pathogenesis of AD has been suggested (McLachlan et al., 1989; Kawahara, 2005; Domingo, 2006; Yokel, 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007).

The results of the current study show that hippocampus accumulated more Al than cerebellum and cortex. A similar finding was also recently observed in our laboratory when rats were intraperitoneally injected with Al (Esparza et al., 2003, 2005). In a previous investigation, Domingo et al. (1996) determined in young (21 days), adult (8 months) and old male rats (16 months), the concentrations of Al in several brain regions following chronic oral administration of this element in drinking water. For most regions, the highest Al concentrations were found in young rats. It would indicate that early stages of the life cycle must be considered for enhanced brain Al accumulation. Based on those results, in the present investigation Al exposure was initiated at 5 months of age. In non-transgenic mice feeding 1 mg Al/g of chow (as Al lactate), Golub et al. (2000) found Al concentrations in whole brain lower than those in the respective control group, being Al levels enhanced when citric acid was added to the diet (Golub and Keen, 1999).

As commented above, to date, only a few data concerning Al concentrations in Al-exposed Tg 2576 mice are available. *Pratico*

et al. (2002b) reported that dietary Al could promote A β accumulation and accelerate amyloid pathology in Tg 2576 mice. The effect of Al on amyloidosis is consistent with an increased brain (hippocampus and cortex) oxidative stress, as it correlated directly with the augmented 8,12-iso-iPF $_{2\alpha}$ -VI levels. However in that study, Al concentrations in hippocampus and cortex were not measured (Pratico et al., 2002b). Although, in the present study Cu concentrations in hippocampus and cerebellum were lower in Tg mice than in wild-type mice, Al treatment produced a significant increase of Cu levels in hippocampus of Tg mice. Maynard et al. (2002) also reported a decrease of Cu concentration in the brain of Tg 2576 mice at 11 months of age. Consequently, Cu deficiency develops along with the classic A β -amyloid pathology of AD. This is an important issue, as it suggests that the decreased Cu levels in AD brain could further increase A β production, perpetuating a pathogenic cascade of events. Several neurodegenerative diseases including AD are characterized by modified Cu homeostasis. This change seems to contribute, either directly or indirectly, to increased oxidative stress, an important factor in neuronal toxicity. When coupled to misfolded proteins, this modified Cu homeostasis appears to be an important factor in the pathological progression of AD (Donnelly et al., 2007). However, the mechanism of the Cu depletion and the pools of Cu affected in AD remains largely unknown (Maynard et al., 2002, 2005, 2006; Klevay, 2008).

Recently, Becaria et al. (2006) evaluated the effect of a 3-month exposure of mice to copper sulfate, Al lactate, or a combination of both compounds. The design was based on the observations that Al present in the drinking water enhanced inflammatory markers in the CNS (Campbell, 2004). Moreover, in transgenic mouse models of AD, dietary Al increased markers of lipid peroxidation and A β levels (Pratico et al., 2002a,b). In isolated systems, Al can potentiate the oxidative stress produced by transition metals such as Fe (Bondy and Kirstein, 1996) or Cu (Bondy et al., 1998; Becaria et al., 2003). Copper, present in trace amounts in the drinking water, has been implicated in the accelerated deposition of A β and promotion of oxidative events in the brain of a rabbit model of AD (Sparks and Schreurs, 2003). These results suggested that although Al or Cu might independently initiate inflammatory or oxidative events, they might function cooperatively to increase A β PP levels. Except for this enhancement in A β PP levels, there was no other synergistic interaction between the two metals (Becaria et al., 2006).

The current results show significant differences in Al-treated wild-type and Tg animals in relation to Zn and Mn concentrations in hippocampus and cortex, while in cerebellum differences were observed in Zn levels of Tg mice. Religa et al. (2006) reported a Zn accumulation in AD-affected cortex and concluded that brain zinc accumulation is a prominent feature of advanced AD and is biochemical linked to brain A β peptide accumulation and dementia severity in AD. By contrast, Maynard et al. (2002) found lower levels of Mn and Zn in whole brain of Tg animals in comparison with those of the control group at the same age (11 months). Although the brain region showing the highest Fe levels was cerebellum, in general, no significant treatment-related differences were observed. Similar Fe levels were also reported in brain of 11 months Tg 2576 and wild-type mice (Maynard et al., 2002). Under a normal physiology, Zn and Cu, and to a lesser extent Fe, interact with A β PP and A β , probably existing in a delicate balance between Zn, Cu and Fe. Perturbations in this balance may result from abnormal A β metabolism and synaptic zinc flooding, resulting in a charge in Zn and Cu metabolism leading to the formation of fibrillar A β (Newman et al., 2007).

Nowadays, there are no data about Al, Mn, Cu, Zn and Fe concentrations in liver, kidney and bone of Al-treated Tg 2576 mice. The results of the present study show that Al concentration was higher in kidney of wild-type treated mice. In contrast, no differences in Al

levels in liver and kidney were observed in Tg 2576 mice. In general, dietary Al exposure caused a slight increase in Mn, Cu, Zn and Fe concentrations in the examined tissues.

In previous investigations, we evaluated the variations in various trace elements in Al-loaded male young (4 months) and old (21 months) rats. Animals were exposed to Al in drinking water during 100 days. Although concentration was higher in kidney (old rats) and bone (young rats) (Gómez et al., 1999), no significant differences between control and treated groups were observed in Cu, Fe, Mn, and Zn concentrations in liver, bone, and kidney (Esparza et al., 2000). Moreover, in male rats injected intraperitoneally with Al, the concentration of this element in liver was higher than that in animals in the control group, while that concerning Mn was lower (Esparza et al., 2003). Correlation of these findings to human aging and AD is limited by differences between humans and mice in their metal regulatory mechanisms. In the current investigation, oral Al exposure of female mice for 6 months did not specially affect the genotype transgenic mouse (Tg 2576) in comparison with the wild-type group. Chronic dietary Al exposure enhanced Al, Mn, and Zn concentrations in hippocampus, and caused an increase of Zn concentration in cortex and cerebellum, an increase of Mn in cortex, and an increase of Al in cerebellum. Because brain biometal dysregulation are implicated in neurodegenerative disorders, the imbalance of these elements by environmental and/or dietary reasons should be controlled.

In summary, the results of this investigation shows that Al exposure of Tg 2576 and wild-type mice for 6 months did not produce any important change concerning the genotype of mice, while both groups of animals responded similarly to Al exposure. As Tg 2576 mice are considered as a potential model for AD, the present results would not support the hypothetical role of Al in the etiology of AD. However, it must be taken into account that animals received less Al than that initially planned. Moreover, the silica content in water could also reduce the gastrointestinal Al absorption. Finally, it must be noted that the main goal of the present study was limited to evaluate metal variation in Tg 2576 mice exposed to Al through the diet. Therefore, further investigations should assess oxidative stress and amyloid deposits in brain.

Conflict of interest

None.

Acknowledgement

Financial support for this study was provided by "Fondo de Investigación Sanitaria", Ministry of Health, Spain, through grant no. PI050622.

References

- Atwood, C.S., Huang, X., Moir, R.D., Tanzi, R.E., Bush, A.I., 1999. Role of free radicals and metals ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Metal Ions Biol. Syst.* 36, 309–364.
- Bartzokis, G., Beckson, M., Hance, D.B., Marx, P., Foster, J.A., Marder, S.R., 1997. MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males. *Magn. Reson. Imaging* 15, 29–35.
- Becaria, A., Campbell, A., Bondy, S.C., 2003. Aluminum and copper interact in the promotion of oxidative but not inflammatory events: implications for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 5, 31–38.
- Becaria, A., Lahiri, D.K., Bondy, S.C., Chen, D., Hamadeh, A., Li, H., Taylor, R.T., Campbell, A., 2006. Aluminum and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain. *J. Neuroimaging* 176, 16–23.
- Bondy, S.C., Kirstein, S., 1996. The promotion of iron-induced generation of reactive oxygen species in nerve tissue by aluminum. *Mol. Chem. Neuropathol.* 27, 185–194.
- Bondy, S.C., Guo-Ross, S.X., Truong, A.T., 1998. Promotion of transition metal-induced reactive oxygen species formation by beta-amyloid. *Brain Res.* 799, 91–96.

- Bush, A.I., 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 26, 207–214.
- Campbell, A., 2004. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Ann. NY Acad. Sci.* 1035, 117–132.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V., Hyman, B.T., Younkin, S.G., Hsiao, K.K., 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* 2, 271–276.
- Colomina, M.T., Roig, J.L., Torrente, M., Vicens, P., Domingo, J.L., 2005. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 565–574.
- Domingo, J.L., Llorens, J., Sanchez, D.J., Gomez, M., Llobet, J.M., Corbella, J., 1996. Age-related effects of aluminum ingestion on brain aluminum accumulation and behavior in rats. *Life Sci.* 58, 1387–1395.
- Domingo, J.L., 2006. Aluminum and other metals in Alzheimer's disease: a review of potential therapy with chelating agents. *J. Alzheimers Dis.* 10, 331–341.
- Donnelly, P.S., Xiao, Z., Wedd, A.G., 2007. Copper and Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 128–133.
- Esparza, J.L., Gomez, M., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Corbella, J., 2000. Element variation following chelation therapy in young and old aluminum-loaded rats. In: Centeno, J.A., Coltery, Ph., Vernet, G., Finkelman, R.B., Gibb, H., Etienne, J.C. (Eds.), *Metal Ions in Biology and Medicine*, vol. 6. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 594–596.
- Esparza, J.L., Gómez, M., Romeu, M., Mulero, M., Sánchez, D.J., Mallol, J., Domingo, J.L., 2003. Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J. Pineal Res.* 35, 32–39.
- Esparza, J.L., Gomez, M., Nogue, M.R., Paternain, J.L., Mallol, J., Domingo, J.L., 2005. Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum exposed-rats. *J. Pineal Res.* 39, 129–136.
- Exley, C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380–387.
- Exley, C., Esiri, M.M., 2006. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminum in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 877–879.
- Flaten, T.P., 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 55, 187–196.
- Frautschy, S.A., Yang, F., Irizarry, M., Hyman, B., Daid, T.C., Hsiao, K., Cole, G.M., 1998. Microglial response to amyloid plaques in APP transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 152, 307–317.
- Golub, M.S., Keen, C.L., 1999. Effects of dietary aluminum on pubertal mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 21, 595–602.
- Golub, M.S., Germann, S.L., Han, B., Keen, C.L., 2000. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150, 107–117.
- Golub, M.S., Germann, S.L., Keen, C.L., 2003. Developmental aluminum toxicity in mice can be modulated by low concentrations of minerals (Fe, Zn, P, Ca, Mg) in the diet. *Biol. Trace Elem. Res.* 93, 213–226.
- Gómez, M., Esparza, J.L., Domingo, J.L., Singh, P.K., Jones, M.M., 1999. Chelation therapy in aluminum-loaded rats: influence of age. *Toxicology* 137, 161–168.
- Gómez, M., Esparza, J.L., Nogués, M.R., Giral, M., Domingo, J.L., 2005. Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 104–111.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S.A., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G.M., 1996. Correlative memory deficits, A β elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 174, 99–102.
- Huang, X., Moir, R.D., Tanzi, R.E., Bush, A.I., Rogers, J.T., 2004. Redox-active metals, oxidative stress, and Alzheimer's disease pathology. *Ann. NY Acad. Sci.* 1012, 153–163.
- Kawahara, M., 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 8, 171–182.
- Klevay, L.M., 2008. Alzheimer's disease as copper deficiency. *Med. Hypotheses* 70, 802–807.
- Kowalik-Jankowska, T., Ruta-Dolejsz, M., Wisniewska, K., Lankiewicz, L., Kozłowski, H., 2002. Possible involvement of copper [II] in Alzheimer' disease. *Environ. Health Perspect.* 110, 869–870.
- Liu, G., Huang, W., Moir, R.D., Vanderburg, C.R., Lai, B., Peng, Z., Tanzi, R.E., Rogers, J.T., Huang, X., 2006. Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J. Struct. Biol.* 155, 45–51.
- López-Toledano, M.A., Shelanski, M.L., 2007. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP (Sw, Ind). *J. Alzheimers Dis.* 12, 229–240.
- Lovell, M.A., Robertson, J.D., Teesdale, W.J., Campbell, J.L., Markesbery, W.R., 1998. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 158, 47–52.
- Maynard, C.J., Cappi, R., Volitakis, I., Cherny, R.A., White, A.R., Beyreuther, K., Masters, C.L., Bush, A.I., 2002. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid- β opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J. Biol. Chem.* 277, 44670–44676.
- Maynard, C.J., Bush, A.I., Masters, C.L., Cappai, R., Li, Q.X., 2005. Metals and amyloid- β in Alzheimer' disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 147–159.
- Maynard, C.J., Cappai, R., Volitakis, I., Cherny, R.A., Masters, C.L., Li, Q.X., Bush, A.I., 2006. Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: implications for Alzheimer beta-amyloid pathology. *J. Inorg. Biochem.* 100, 952–962.
- McLachlan, D.R., Lukiw, W.J., Kruck, T.P., 1989. New evidence for an active role of aluminum in Alzheimer' disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 16, 490–497.
- McLachlan, D.R., Kruck, T.P., Lukiw, W.J., Krishnan, S.S., 1991. Would decreased aluminium ingestion reduce the incidence of Alzheimer' disease? *CMAJ* 145, 793–804.
- Milatovic, D., Yin, Z., Gupta, R.C., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, J.L., Aschner, M., 2007. Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* 98, 198–205.
- Morita, A., Kimura, M., Itokawa, Y., 1994. The effect of aging on the mineral status of female mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 42, 165–177.
- Newman, M., Musgrave, F.I., Lardelli, M., 2007. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models. *BBA* 1772, 285–297.
- Perl, D.P., Olanow, C.W., 2007. The neuropathology of manganese-induced Parkinsonism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 657–6822.
- Pratico, D., Clark, C.M., Liun, F., Rokach, J., Lee, V.Y., Trojanowski, J.Q., 2002a. Increase of brain oxidative stress in mild impairment: a possible predictor of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 59, 972–976.
- Pratico, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2002b. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 16, 1138–1140.
- Rao, K.S.J., Rao, R.V., Shanmugavelu, P., Menon, R.B., 1999. Trace elements in Alzheimer's disease brain: a new hypothesis. *Alzheimer's Rep.* 2, 241–246.
- Religa, D., Strozzyk, D., Cherny, R.A., Volitakis, I., Haroutunian, V., Winblad, B., Naslund, J., Bush, A.J., 2006. Elevated cortical zinc in Alzheimer' disease. *Neurology* 67, 69–75.
- Rodrigo, J., Fernandez-Vizcarra, P., Castro-Blanco, S., Bentura, M.L., Nieto, M., Gomez-Isla, T., Martinez-Murillo, R., Martinez, A., Serrano, J., Fernandez, A.P., 2004. Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg 2576 transgenic mice. *Neuroscience* 128, 73–89.
- Shcherbatykh, I., Carpenter, D.O., 2007. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 11, 191–205.
- Sparks, D.L., Schreurs, B.G., 2003. Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 11065–11069.
- Strong, M.J., 1994. Aluminum neurotoxicity; an experimental approach to the induction of neurofilamentous inclusions. *J. Neuro Sci.* 124, 125–131.
- Takeda, A., 2003. Manganese action in brain function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 41, 79–87.
- Torrente, M., Colomina, M.T., Domingo, J.L., 2005. Behavioral effects of adult rats concurrently exposed to high doses of oral manganese and restraint stress. *Toxicology* 211, 59–69.
- Walton, J.R., 2007. An aluminium-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration. *J. Inorg. Biochem.* 101, 1275–1284.
- World Health Organization WHO/IPCS, 1997. *Aluminum Environ. Health Criteria WHO 194*, Geneva, pp. 1–152.
- Yokel, R.A., 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21, 813–828.
- Yokel, R.A., 2006. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contributed to metal-induced neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.* 10, 223–253.
- Yokel, R.A., Florence, R.L., 2006. Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acid sodium aluminum phosphate, incorporated in to a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227, 86–93.

2. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum

Authors: Tania Garcia, José L. Esparza, M. Rosa Nogués, Marta Romeu, José L. Domingo, Mercedes Gómez

Hippocampus (2010); 20(1): 218-225

Està ben establert, que l'alumini (Al) és un agent neurotòxic que indueix la producció de radicals lliures en el cervell. Per altre banda, la melatonina (Mel) és un conegut antioxidant que pot actuar directament com a neutralitzador dels radicals lliures o indirectament al induir l'expressió gènica de certs gens relacionats amb la defensa antioxidant. En aquest estudi, ratolins femelles transgènics per A β PP (Tg2576, Tg) i *wild-type* (5 mesos d'edat), van ser alimentats amb lactat d'alumini a través de la dieta (1 mg Al/g dieta). Simultàniament, els animals van rebre una dosi oral de Mel (10 mg/kg) dissolta en l'aigua de beguda fins al final de l'estudi, als 11 mesos d'edat. Es van incloure quatre grups de tractament tan pels ratolins Tg com pels ratolins *wild*: Control, Al, Mel i Al+Mel. Al final del període de tractament, l'hipocamp va ser extret i processat per examinar els diferents marcadors d'estrès oxidatiu: glutatió reduït (GSH), glutatió oxidat (GSSG), superòxid dismutasa (SOD), glutatió reductasa (GR), glutatió peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), i les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric (TBARS). A més, es va avaluar l'expressió gènica de la Cu-ZnSOD, GR i la CAT mitjançant una RT-PCR a temps real. També es va determinar la concentració d'Al en l'hipocamp dels animals. Els canvis bioquímics observats en aquest teixit van suggerir que l'Al podria actuar com un possible agent prooxidant. La melatonina realitza una acció antioxidant al incrementar els nivells d'mRNA dels enzims antioxidants SOD, CAT, i GR avaluades en presència de Al+Mel, amb independència del model animal.

Paraules clau: ratolins Tg2576, alumini, melatonina, marcadors d'estrès, enzims antioxidants.

Oxidative Stress Status and RNA Expression in Hippocampus of an Animal Model of Alzheimer's disease After Chronic Exposure to Aluminum

Tania Garcia,¹ José L. Esparza,¹ M. Rosa Nogués,² Marta Romeu,² José L. Domingo,¹ and Mercedes Gómez^{1*}

ABSTRACT: It is well established that aluminum (Al) is a neurotoxic agent that induces the production of free radicals in brain. Accumulation of free radicals may cause degenerative events of aging such as Alzheimer's disease. On the other hand, melatonin (Mel) is a known antioxidant, which can directly act as free radical scavenger, or indirectly by inducing the expression of some genes linked to the antioxidant defense. In this study, A β PP female transgenic (Tg2576) (Tg) and wild-type mice (5 months of age) were fed with Al lactate supplemented in the diet (1 mg Al/g diet). Simultaneously, animals received oral Mel (10 mg/kg) dissolved in tap water until the end of the study at 11 months of age. Four treatment groups were included for both Tg and wild-type mice: control, Al only, Mel only, and Al+Mel. At the end of the period of treatment, hippocampus was removed and processed to examine the following oxidative stress markers: reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Moreover, the gene expression of Cu-ZnSOD, GR, and CAT was evaluated by real-time RT-PCR. Aluminum concentration in hippocampus was also determined. The biochemical changes observed in this tissue suggest that Al acts as a pro-oxidant agent. Melatonin exerts an antioxidant action by increasing the mRNA levels of the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GR evaluated in presence of Al and Mel, with independence of the animal model. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Tg2576 mice; aluminum; melatonin; stress markers; antioxidant enzymes

INTRODUCTION

The brain is a target organ for aluminum (Al) toxicity. Until recent decades, when Al was found in the brain of patients suffering from Alzheimer's disease (AD), human Al intake through food, drinking water, medications or other sources had been thought to have no serious effects on physiological processes (Flaten, 2001; Kaneko et al., 2004).

¹Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, "Rovira i Virgili University", Sant Llorenç 21, Reus, Catalonia, Spain; ²Pharmacology Unit, School of Medicine, IISPV, "Rovira i Virgili University", Sant Llorenç 21, Reus, Catalonia, Spain

Grant sponsor: "Fondo de Investigación Sanitaria", Ministry of Health, Spain; Grant number: PI050622.

*Correspondence to: Mercedes Gómez, Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, "Rovira i Virgili University", Sant Llorenç 21, Reus 43201, Spain.

E-mail: mariamercedes.gomez@urv.cat

Accepted for publication 8 March 2009

DOI 10.1002/hipo.20612

Published online 29 April 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

In recent years, various epidemiological studies have suggested that Al might play a pathogenic role in AD (Kawahara, 2005; Shcherbatykh and Carpenter, 2007). AD is the most common cause of dementia in humans. It is a progressive neurodegenerative disorder that gradually deprives the patient of cognitive function. AD is mainly characterized by the presence of neuritic plaques and neurofibrillary tangles in hippocampus and neocortex of the brain (Yokel and Florence, 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007; Gómez et al. 2008). The neuropathological characteristics of AD include cortical and subcortical atrophy, formation of intraneuronal neurofibrillary tangles, deposition of amyloid beta peptide (A β) in neuritic plaques or senile plaques, and formation of neuropil threads, loss of synaptic function, oxidative stress and apoptosis, leading to neuronal loss (Kaneko et al., 2004; Gupta et al., 2005; Hirata-Fukae et al., 2008). These events are mainly observed in the hippocampal and cortical regions of AD brains.

Epidemiological studies have indicated that women could possess a higher risk for AD. However, the precise cause of this remains unknown (Maynard et al., 2006; Shcherbatykh and Carpenter, 2007). Recently, Hirata-Fukae et al. (2008) reported that A β 1-40 levels were higher in Tg2576 female mice than in males. Notwithstanding, A β 1-42 were not different at 15 months of age. The A β degrading enzyme neprilysin has a notably reduced level in female mice, which suggests a possible cause of the higher risk for AD in women (Huang et al., 2006).

It has been also demonstrated that the brain of patients with AD is damaged by reactive oxygen species (ROS) (Markesbery, 1997; Kaneko et al., 2004). It is well known that the central nervous system is highly vulnerable to attacks from ROS due to the brain's high oxygen consumption rate, the abundant lipid contents, as well as the relatively low levels of antioxidant enzymes in comparison with other tissues (Esparza et al., 2003, 2005; Kaneko et al., 2004; Gómez et al., 2005).

On the other hand, transition metals are essential, for example, for the synthesis of a large number of enzymes, O₂ transport, and a number of redox reactions (Berg et al., 2004). Aluminum is not a transition

metal like copper, zinc, or iron, and therefore, it cannot directly initiate oxidative injury. However, Al has been suggested to stimulate iron-induced and noniron-induced lipid peroxidation *in vitro* (Kaneko et al., 2004). Moreover, a number of recent studies have shown that Al produces lipid peroxidation in mammals (Pratico et al., 2002; Esparza et al., 2003, 2005; Abd-Elghaffar et al., 2005; Gómez et al., 2005; Albendea et al., 2007; Gonzalez et al., 2007). The possible role of Al in AD rises the important question whether Al can enter the brain, and if it does, which is (are) the mechanism(s) of entry? For it, three routes have been proposed: blood-brain barrier (BBB), nasal olfactory pathway, and cerebrospinal fluid (CSF) (Yokel et al., 1999).

Since a phylogenetic point of view, melatonin (Mel) is a molecule present in organisms from unicellular to mammals. Because tryptophan and serotonin, both precursors of Mel, are present at the early stages of cell phylogeny, the presence of this hormone is also suggested (Maharaj et al., 2007). Tryptophan metabolites, including Mel, are antioxidants. From a hypothetical point of view, the first function of Mel may be as an antioxidant agent (Acuña-Castroviejo et al., 2001).

In the past 10–12 years, a number of researchers have documented the ability of Mel to directly neutralize free radicals and related toxicants. When injected or when given orally to animals, Mel levels quickly rise in blood, being shortly followed by its uptake into tissues (Ananth et al., 2003). There are no morphophysiological barriers to Mel (Menedez-Peláez and Reiter, 1993), which has direct scavenging actions: neutralizing superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) (Zang et al., 1998), removing hydrogen peroxide (H_2O_2) (Reiter et al., 2000), as a direct scavenger of hydroxyl radical ($\cdot OH$) (Tan et al., 1993), neutralizing singlet oxygen (1O_2) (Cagnoli et al., 1995), and scavenging peroxy radicals ($LOO\cdot$), (Reiter and Tan, 1998) and peroxy nitrite anions ($ONOO^-$) (Zang et al., 1998; Maharaj et al., 2007).

The expression of some enzymes mainly related to the endogenous antioxidant system of the cell such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), and nitric oxid synthase (NOS) are under genomic regulation by Mel (Liu et al., 2003; Maharaj et al., 2007). Melatonin has been reported to influence antioxidant enzyme activity and cellular mRNA levels for these enzymes, both under physiological conditions and conditions of elevated oxidative stress (Kotler et al., 1998; Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005).

The depletion of Mel with age has been associated with a number of neurodegenerative diseases such as AD and Parkinson disease (PD). Coincidental with a number of neurodegenerative disorders is the accumulation of metals such as Al in AD, iron in PD, and copper in Wilson's disease and AD. Thus, the role of Mel as a metal chelator has attracted the interest of some investigators (Limson et al., 1998; Gulcin et al., 2003). The fact that *in vitro* Mel binds to iron (III), but not iron (II), suggests that this hormone removes iron (III) unbound to a protein, thus preventing it from Fenton reaction. The ability of Mel to serve as a metal chelator provides further evidence supporting its role as a neuroprotective agent.

Nowadays, there are several genetically engineered AD mouse models. Alterations in hippocampus cell proliferation have been identified in transgenic (Tg) mouse models of AD. However, relatively little is known about the underlying mechanisms (Li et al., 2008). The amyloid precursor protein ($A\beta$ PP)(SW) transgenic mouse (Tg2576) is an animal that expresses high levels of the mutant amyloid-peptide ($A\beta$) in the cell body of neurons, neuronal loss, synaptic alterations, inflammation and gliosis, and dendritic alterations, having a phenotype characterized by memory deficits after 9–10 months of life. This mouse is currently considered as an experimental model of AD (Chapman et al., 1999; Pratico et al., 2002; Rodrigo et al., 2004; Maynard et al., 2006; López-Toledano and Shelanski, 2007; Duyckaerts et al., 2008). Only results of a few studies concerning Al effects in these animals have been reported (Pratico et al., 2002; Drago et al., 2008; Gómez et al., 2008; Ribes et al., 2008). In relation to it, Pratico et al. (2002) studied in Tg2576 mice the effects of dietary Al administration (2 mg of Al/kg of diet). An increase of 8,12-iso- $iPF_{2\alpha}$ -VI levels in cortex and hippocampus was observed, as well as a relationship with Al content in brain.

The aim of the present investigation was to assess in hippocampus of Tg2576 mice, the oxidative imbalance induced after dietary Al exposure during 6 months. The ability of Mel to attenuate Al effects was also examined. This was done by evaluating the protective role of Mel for regulating gene expression of some antioxidant enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals, Animals, and Treatment

Aluminum, as Al lactate (Sigma Chemical, St. Louis, MO), was administered through the diet. Regular chow was supplemented with 1 mg of Al per gram of chow (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) (Gómez et al., 2008). Melatonin was also purchased from Sigma Chemical.

$A\beta$ PP transgenic mice were bred from a breeding pair of Tg2576 mice (Taconic Europe, Ejby, Denmark). An authorization from Taconic Europe was obtained for the cross breeding. The Tg2576 colony was maintained by crossing Tg2576 males with C57BL6/SJL (wild-type) F1 females. At 2 months of age, the transgenic status was determined by PCR of tail DNA. Females were then separated into transgenic and wild-type. Because of the aggressive behavior among males resulting in frequent injuries, only females were used. Animals (15–20 g) were housed in a room equipped with automatic light cycles (12 h light/dark), and maintained at $22^\circ C \pm 2^\circ C$ and relative humidity of 40–60%. Food and tap water were offered *ad libitum* throughout the study. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Research, “Rovira i Virgili” University (Tarragona, Spain).

At 5 months of age, treatment was initiated. One group of animals (control group) received regular chow and tap water. A

second group of mice was given a supplement of Al lactate in the diet (1 mg of Al/g diet) (Al group) (Golub et al., 2003; Gómez et al., 2008) and tap water. Animals treated with Mel received 10 mg/kg/day in the drinking water (Nogués et al., 2006). Melatonin was dissolved in absolute ethanol and added to the drinking water at a final ethanol concentration of 0.066% in feeding bottles protected from the light. Fresh Mel solutions were prepared twice a week. The experimental groups were distributed as follows: control wild-type (Control wild), control Tg2576 (Control Tg), Al wild-type (Al wild), Al Tg2576 (Al Tg), Mel wild-type (Mel wild), Mel Tg2576 (Mel Tg), Al+Mel wild-type (Al+Mel wild), and Al+Mel Tg2576 (Al+Mel Tg). Chow was replaced twice per week until the end of the study at 11 months of age. Food consumption was measured during the first month of treatment. No differences in chow intake between control and treated animals were found (data not shown).

Tissue Samples

At the end of the experimental period, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) dissolved in 0.9% saline. Subsequently, animals were decapitated and the brain was removed. The brain was placed on an ice-cold plate, and the hippocampus was dissected from the surface of the corpus callosum. The dissection procedures required less than 3 min per animal. Twelve animals per group were used for evaluation of oxidative stress markers and gene expression. Six animals were utilized for determining Al concentrations.

Hippocampus samples were homogenized in 0.2 M cold sodium phosphate pH 6.25 buffer, in a Potter-Elvehjem homogenizer fitted with a Teflon pestle. The crude soluble fraction was obtained after centrifugation at 105,000g for 1 h and the parameters below described were analyzed. The fresh crude soluble fraction was divided into two parts. The first one was precipitated with cold 70% trichloroacetic acid (TCA) (final concentration 10%) and centrifuged. The supernatant was stored at -20°C to determine reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). The second fraction was aliquoted and stored at -20°C to determine superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and protein content (Esparza et al., 2005, Gómez et al., 2005)

The hippocampus of six animals were also dissected and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before being used for isolation of RNA. Total cellular RNA was isolated from the samples using ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). The purity and concentrations of RNA were estimated by the relative absorbance at 260 nm/280 nm determined by spectrometry (GeneQuan II, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). The hippocampi of six animals were processed to determine Al concentrations.

Biochemical Analysis

Protein content was measured by the Bradford method (1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard (E. Merck, Darmstadt, Germany). SOD, CAT, and GR activities, as well as TBARS contents, were determined according to previously described methods (Esparza et al., 2005). GSH and GSSG were measured as reported by Hissin and Hilf (1976) in a LS50 Perkin Elmer (Baconfield, UK) fluorimeter at 350 nm and 420 nm (excitation and emission wavelengths, respectively). GPx activity was measured by the method of Wheeler et al. (1990). Both, selenium-dependent and selenium-independent peroxidase activities were determined by this method.

RT-PCR Real Time Analysis

One microgram of total RNA was reversely transcribed to cDNA using random hexamers and MultiScribe Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's instructions. For each sample, Cu-ZnSOD (SOD1, cytosolic), CAT, and GR mRNA expression was quantified by real-time PCR with the use of an ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA) combined with a dual-label fluorogenic detection system (TaqMan) based on the 5'-nuclease assay. The detection system software calculates the ΔR_n using the equation $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, where R_n^+ is the fluorescence signal of the product at any given time and R_n^- is the fluorescence signal of the baseline emission.

Primers and TaqMan probes for Cu-ZnSOD (ref. Mm01344233_g1), CAT (ref. Mm00437992_m1), and GR (ref. Mm00833903_m1) were obtained from validated and pre-designed Assays-on-Demand products of Applied Biosystems, being used in real time PCR amplifications. The 18s rRNA (ref. Hs99999901_s1) was used as endogenous control. The following cycle conditions in PCR reaction were used: 95°C for 10 min to activate the Taq Gold DNA polymerase, and subsequently 40 cycles at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. These reactions were performed in triplicate using 5 μl of cDNA in a 25 μl volume reaction. For each sample, Cu-ZnSOD, CAT, and GR mRNA levels were calculated by means of a comparative cycle threshold (Ct) method using $2^{-\Delta\Delta C_t}$, according to the manufacturer's instructions (ABI Prism 7700, 1997). The fold change in target gene relative to the endogenous control was determined by:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

where $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{endogenous}}})_{\text{treated group}} - (C_{t_{\text{target}}} - C_{t_{\text{endogenous}}})_{\text{control group}}$

In this experiment, the untreated sample (control group) was defined as the calibrator. Therefore, the amounts of Cu-ZnSOD, GR, and CAT transcripts in the other samples were assigned dimensionless numbers relative to the levels in the calibrator sample.

Aluminum Analysis

Tissue samples were weighed in a microsampling quartz insert, and 65% nitric acid (Supapur, E. Merck) was added to digest the samples. The microsampling inserts were then introduced in Teflon vessels and put into a microwave oven Star D (Milestone, Sorisole, Italy) (Gomez et al., 2008). All materials were previously washed with 10% nitric acid to avoid any potential contamination. For quality control, brain reference standards (prepared in-house), and NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD) were measured in each assay. Aluminum concentrations were determined by means of a computer-controlled sequential inductively coupled plasma spectrometer (Perkin Elmer Elan 600) according to DIN EN ISO 17294-2. Detection limit was: 1.00 µg/kg.

Data Analysis and Statistics

Statistical analysis was performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Overall effects of genotype, aluminum, and melatonin treatments on the hippocampus of mice were analyzed by an ANOVA test. An univariate analysis of variance (ANOVA) was performed using genotype (wild and transgenic), treatment (Control, Al, Mel, and Al+Mel) and their interaction as between-individuals fixed factors. These interaction terms were significant ($P < 0.001$) in all biochemical oxidative stress markers. According to this, differences between treatments within each genotype, or differences between genotypes within each treatment, were analyzed. Paired comparison and Scheffe test (as a post hoc test) were applied to determine the level of significance between groups. Results are given as mean values \pm standard deviation (SD). For all tests, the level of statistical significance was established at $P < 0.05$.

RESULTS

General Effects

There were no deaths during the treatment period. Mice exposed to Al did not show any differences in body weight gain in comparison to the respective control groups. No signifi-

cant differences were observed in the weight of the whole brain in mice of control, Al, Mel, and Al+Mel Tg or wild-type groups, in comparison with control mice (data not shown).

Aluminum Concentrations

The levels of Al in hippocampus of mice are summarized in Table 1. A significant overall effect of Al ($P < 0.001$) was observed. The concentrations increased in all Al-exposed (Al and Mel+Al) groups independently on the genotype. However, only in transgenic and wild-type Al + Mel animals the difference was statistically significant, depending on the genotype. Aluminum levels in the Mel transgenic group showed higher values than the respective controls. However, in the wild-type group Al concentration was lower.

Oxidative Stress Markers

The analyses of oxidative stress markers in hippocampus of control and treated groups are shown in Table 2. An overall effect of the genotype in GSSG was found ($P = 0.007$) showing Tg mice higher GSSG levels than wild-type animals.

An overall effect of Al was found in GR ($P < 0.001$), SOD ($P = 0.004$), and GSH ($P = 0.002$). Mice treated with aluminum showed higher levels of GSH, but lower SOD and GR concentrations than nontreated animals. Moreover, an overall effect of melatonin in GPx ($P < 0.001$), GR ($P < 0.001$), and GSH ($P = 0.013$) was also found. Mice treated with melatonin showed higher levels of GSH, but lower levels of GPx and GR than nontreated animals.

When all groups were compared, the oxidative stress markers showed significant differences in GSH, SOD, and GR, but not in GSSG, CAT, GPx and TBARS. The levels of GSH increased in Al+Mel Tg and wild-type groups. Animals exposed to Al or Mel only did not show any difference due to the genotype. A similar pattern was observed when groups of the same genotype were compared. SOD and GR decreased in Al+Mel wild-type, and in Al+Mel Tg/wild-type groups, respectively. Data of groups evaluated by genotype also revealed differences in GR of Al+Mel Tg/wild-type animals. SOD and GPx increased the level of significance depending on genotype only in wild animals. SOD decreased in Al+Mel wild-type with regard to Mel and control wild groups. GPx of Al+Mel wild-type groups increased

TABLE 1.

Concentrations (µg/g) of Aluminum in Hippocampus of Mice Treated with Aluminum, Melatonin, and Aluminum Plus Melatonin

	Control	Al	Mel	Al + Mel
Wild	1.99 \pm 0.65 ^{a,1,2}	3.07 \pm 0.75 ^{b,1}	1.69 \pm 0.4 ^{a,2}	2.37 \pm 0.77 ^{b,1,2}
Tg-2576	1.43 \pm 0.29 ^{a,1}	2.70 \pm 0.66 ^{b,2,3}	2.10 \pm 0.23 ^{a,1,2,3}	3.06 \pm 0.81 ^{b,3}

Results are expressed as mean values \pm SD. Different numbers (superscripts 1,2,3) indicate significant differences when groups of the same genotype were compared (ANOVA/Scheffe). Different letters (superscripts a,b) indicate significant differences between all groups for genotype as fixed factor (ANOVA/Scheffe). The level of significance was established at $P < 0.05$.

TABLE 2.

Biochemical Oxidative Stress Markers in Hippocampus of Mice Treated with Aluminum, Melatonin, and Aluminum Plus Melatonin

	Control wild	Al wild	Mel wild	Al+Mel wild	Control Tg	Al Tg	Mel Tg	Al+Mel Tg
Proteins (mg/g fresh tissue)	33.34 ± 7.71	33.89 ± 5.49	37.26 ± 5.82	33.99 ± 6.55	32.49 ± 7.31	33.52 ± 5.44	31.88 ± 5.99	30.57 ± 5.43
GSH (nmol/mg protein)	14.77 ± 3.70 ^{a,1}	14.60 ± 2.25 ^{a,1}	14.47 ± 4.66 ^{a,1}	20.10 ± 4.60 ^{b,2}	14.73 ± 4.52 ^{a,1}	16.15 ± 3.61 ^{a,1}	15.89 ± 3.48 ^{a,1}	25.38 ± 2.74 ^{b,2}
GSSG (nmol/mg protein)	7.84 ± 2.49 ^{1,2}	6.72 ± 1.68 ^{1,2}	6.26 ± 1.41 ¹	9.86 ± 3.50 ²	8.57 ± 3.05	8.22 ± 2.60	8.95 ± 2.67	8.95 ± 1.89
SOD (U/mg protein)	32.31 ± 8.84 ^{a,1}	29.00 ± 3.64 ^{a,1,2}	31.65 ± 6.49 ^{a,1}	14.13 ± 5.00 ^{b,2}	30.84 ± 6.32 ^a	26.03 ± 6.53 ^a	32.62 ± 5.86 ^a	26.41 ± 4.05 ^b
CAT (µmol/min/mg protein)	3.96 ± 1.38	3.86 ± 1.38	4.01 ± 1.14	2.65 ± .56	3.80 ± 1.20	3.27 ± 1.15	3.23 ± 1.11	2.49 ± 0.29
GR (U/mg protein)	107.45 ± 18.10 ^{a,1}	87.91 ± 10.73 ^{a,1}	73.76 ± 13.15 ^{b,1}	32.21 ± 6.89 ^{b,2}	119.65 ± 19.38 ^{a,1}	95.81 ± 10.85 ^{a,1}	72.15 ± 13.41 ^{a,1}	46.61 ± 21.13 ^{b,2}
GPx (mU/mg protein)	12.15 ± 2.39 ^{a,1}	10.16 ± 1.20 ^{a,1}	11.93 ± 2.73 ^{a,1}	22.75 ± 2.78 ^{b,2}	12.02 ± 1.90 ^{a,1}	26.95 ± 15.41 ^{a,2}	12.82 ± 2.17 ^{a,1,2}	21.49 ± 12.56 ^{b,2}
TBARS (nmol/mg protein)	1.57 ± 0.35	2.21 ± 0.28	1.94 ± 0.74	1.40 ± 0.73	2.01 ± 0.41	2.46 ± 0.71	2.15 ± 1.17	1.64 ± 0.43

Results are expressed as mean values ± SD. Different numbers (superscripts 1,2,3) show significant differences when groups of the same genotype were compared (ANOVA/Scheffe). Different letters (superscripts a,b) indicate significant differences between all groups for genotype as fixed factor (ANOVA/Scheffe). The level of significance was established at $P < 0.05$.

with respect to the remaining wild groups, whereas GSSG increased in comparison with Mel-treated animals. No differences were noted in CAT and TBARS depending on the genotype.

mRNA Expression

The relative mRNA levels of the antioxidant enzymes Cu-ZnSOD (SOD1), CAT, and GR in hippocampus were quantified by real time RT-PCR (Fig. 1). Only an overall effect of melatonin ($P = 0.050$) in CAT mRNA expression was found, showing melatonin-treated mice a higher expression. The results show that concurrent administration of Al and Mel significantly induced gene expression of Cu-ZnSOD in all gene types. Animals exposed to Al and Mel significantly increased the relative expression of CAT, with no genotypic difference. Similar behavior was observed in GR, which significantly enhanced the mRNA expression in Mel Tg and Al+Mel Tg/wild-type groups. The last two groups increased the relative m-RNA levels of GR four times with respect to the controls. On the other hand, catalase diminished in all groups exposed to Al only, reaching the level of significance in the Al Tg group. Melatonin wild-type groups showed a decrease in the expression of GR and SOD.

DISCUSSION

Animals experimentally exposed to Al invariably show a number of indicators of oxidative stress. These include changes in the levels of antioxidants such as GSH, SOD, and GR. However, no differences attributable to genotypic condition have been reported in the levels of GSSG, CAT, GPx and biomarkers of lipid peroxidation such as TBARS (Moumen et al., 2001; Esparza et al., 2003).

In this study, animals were fed with Al supplemented chow during a period of 6 months (between 5 and 11 months of age). Aluminum-exposed groups did not show any reduction in body weight gain, in total brain weight, or deaths during the treatment. With respect to Al concentrations in hippocampus, these were higher in the Al-treated groups (with or without Mel), being statistically significant in Al-exposed transgenic groups. A number of studies have shown that Al-exposed animals increased Al concentrations in whole brain, or in neural areas such as the hippocampus (Colomina et al., 2002; Esparza et al., 2003; Gomez et al., 2005, 2008). In this study, Al levels in wild type and Tg mice were very similar.

Because binding sites for Mel have been found in the hippocampus of several mammals, it has been suggested that this pineal hormone could be able to modulate neuronal functions of hippocampal cells (Musshoff et al., 2002). Lack et al. (2001) demonstrated that Mel might interact with a number of metal ions including Al. It was concluded that the chelation of metals by indolamines (such as Mel) could have important biological and pharmaceutical consequences (Lack et al., 2001). In the current investigation, no differences in Al concentrations in hippocampus between the Al only group (transgenic and wild

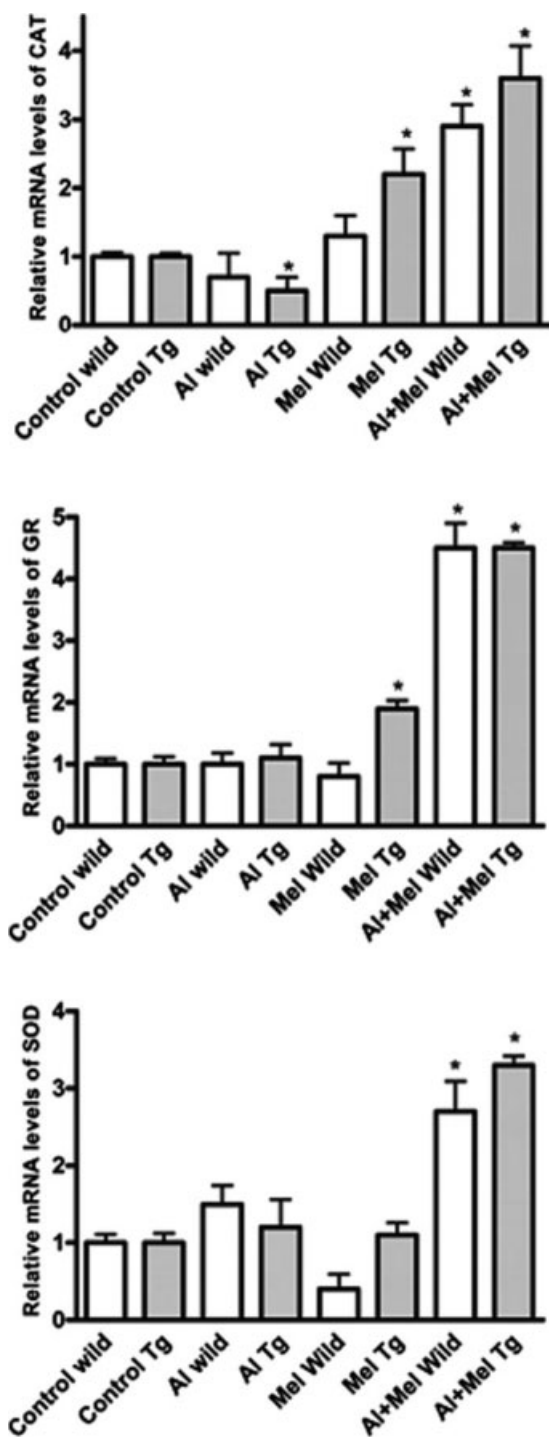


FIGURE 1. Relative mRNA levels of CAT, SOD and GR. Control groups were designed to be 1.0. Data are given as mean values \pm SD. An asterisks indicates significant differences with the respective control group ($P < 0.05$).

mice) and the Al plus Mel group (transgenic and wild mice) were found. Consequently, Mel would not act as an Al chelator. Aluminum exposure did not increase the level of TBARS in hippocampus, which is not in agreement with our previous results in rats (Gomez et al., 2005).

In recent years, a number of investigators have demonstrated that Al administration increased lipid peroxidation in the rat brain (Pratico et al., 2002; Luo et al., 2007; Candan and Tuzmen, 2008). The administration route (diet) and the dose of Al did not increase the levels of TBARS as observed in previous studies in which exposure to this element was higher. An Al increase in brain after chronic exposure to this element was not found in rats given dietary Al (1 mg of Al/g of diet) (Golub et al., 2000). Yokel and Florence (2006) reported that Al bioavailability from water was higher than that from food (0.3% vs. 0.1%, respectively).

The main objective of the activation of defense mechanisms is the neutralization and catabolism of the oxidant agents. In this study, after 6 months of Al exposure, the levels of GSH in the rat hippocampus significantly increased following Mel administration in presence of Al. GSH acts as a cellular reducing agent, being the main function to protect against oxidative stress and cellular aging. Moreover, GR levels decreased in Al-exposed mice independently on the genotype. However, SOD decreased only in wild mice. The results of the present investigation show changes in the activity of GSSG, and GPx in wild, but not in Tg2576 mice. The stimulation of GSH synthesis by Mel could be a major antioxidant action of this hormone (Reiter et al., 2003; Tomás-Zapico and Coto-Montes, 2005).

The most abundant ROS formed during cellular metabolism is the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$). The first enzymatic reaction in the reduction pathway of oxygen occurs during the dismutation of two molecules of $O_2^{\cdot-}$, when they are converted to H_2O_2 and diatomic oxygen (Rodríguez et al., 2004). At this step, the enzyme is the CuZnSOD, which is present in the cytosol. In addition, two enzymes participate in the removal of H_2O_2 : glutathione peroxidase and catalase (Rodríguez et al., 2004). Although in the current study, Mel administration decreased SOD activities in the hippocampus of Al+Mel animals, no changes in CAT activity were found, while only activity of GPx in Al+Mel wild mice was observed.

Antioxidant enzymes are regulated by multiple factors. Oxidative status of the cell is the primary factor regulating gene expression and activity of these enzymes (Rodríguez et al., 2004). Both, endogenous (Nicotera et al., 1989) and exogenous (Yoo et al., 1999) agents act as oxidants, altering cellular oxidative equilibrium, and consequently, antioxidant enzyme gene expression.

Melatonin is a direct free radical scavenger. Therefore, its regulation of gene transcription for antioxidant enzymes can be of special interest. The antioxidant properties of Mel have been extensively studied, as well as the use of this molecule as a cell protector and as a potential disease-preventing agent (Karbownik and Reiter, 2000; Reiter and Tan, 2003; Bandyopadhyay and Chattopadhyay, 2006). Various in vivo and in vitro studies have shown the influence of Mel on antioxidant enzyme activity. The increase of GPx, Cu-ZnSOD, and MnSOD activity in the rat brain and in several tissues of chicks after exogenously administered Mel has been reported (Kotler et al., 1998; Rodríguez et al., 2004). It has been also shown that Mel increases gene expression of these antioxidant enzymes.

In the current study, relative mRNA levels of Cu-ZnSOD, GR, and CAT increased in the hippocampus of mice concurrently treated with Al and Mel. These results do not corroborate that an increase of SOD activity corresponds with an increase of mRNA levels. No direct correlation was found in the gene expression of CAT and GR and their respective activities. These events could be explained because post-transcription events such as translation or transport of gene products might be altered. It would result in a loss of functional molecules, minor post-translational changes, and finally, in a lack of changes on activity of these enzymes. Although the mechanisms involved in the regulation of antioxidant enzymes by Mel have not been clearly established *in vivo*, it is known that stimulation of antioxidant enzyme gene expression occurs at nanomolar concentrations of Mel in cultured cells (Mayo et al., 2002). Notwithstanding, the intracellular molecular pathways involved in the regulation of antioxidant enzyme gene expression and/or activity by Mel are still unknown (Rodríguez et al., 2004).

In summary, the results of the current investigation show that the levels of Al in hippocampus of transgenic mice were not higher than those in wild-type animals. There were not evident differences between Al-exposed wild-type and Tg2576 mice in promoting oxidative stress in the hippocampus. The biochemical changes observed in this tissue indicate that Al acts as pro-oxidant agent, while Mel exerts an antioxidant action by increasing the mRNA levels of the antioxidant enzymes SOD, GR, and CAT, evaluated in presence of the toxicant and Mel, which is independent on the animal genotype.

REFERENCES

- ABI Prism 7700. 1997. Sequence Detection System. User Bulletin No. 2. Revision A. Foster City, CA: Applied Biosystems.
- Abd-Elghaffar SKh, El-Sokkary GH, Sharkawy AA. 2005. Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: Protective effect of melatonin. *Neuro Endocrinol Lett* 26:609–616.
- Acuña-Castroviejo D, Martín D, Macías E, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter RJ. 2001. Melatonin, mitochondrial and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30:65–74.
- Albendea CD, Gómez-Trullén EM, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Millán-Plano S, Reyes-Gonzalez MC, Martínez-Ballarín E, García JJ. 2007. Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminum. *J Trace Elem Med Biol* 21:261–268.
- Ananth C, Gopalakrishnakone P, Kaur C. 2003. Protective role of melatonin in domoic acid-induced neuronal damage in the hippocampus of adult rats. *Hippocampus* 13:375–387.
- Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A. 2006. Reactive oxygen species-induced gastric ulceration: Protection by melatonin. *Curr Med Chem* 13:1187–1202.
- Berg D, Youdim MBH, Riederer P. 2004. Redox imbalance. *Cell Tissue Res* 318:201–213.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. 1995. Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 18:222–226.
- Candan N, Tuzmen N. 2008. Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminum and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Neurotoxicology* 29:708–713.
- Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK. 1999. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2:271–276.
- Colomina MT, Roig JL, Sanchez DJ, Domingo JL. 2002. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology* 23:775–781.
- Drago D, Cavaliere A, Mascetra N, Ciavardelli D, Di Ilio C, Zatta P, Sensi SL. 2008. Aluminum modulates effects of beta amyloid(1-42) on neuronal calcium homeostasis and mitochondria functioning and is altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation Res* 11:861–871.
- Duyckaerts C, Poitier MC, Delatour B. 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115:5–38.
- Esparza JL, Gomez M, Romeo M, Mulero M, Sanchez DJ, Mallol J, Domingo JL. 2003. Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: Protective role of exogenous melatonin. *J Pineal Res* 35:32–39.
- Esparza JL, Gómez M, Nogués MR, Paternain JL, Mallol J, Domingo JL. 2005. Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J Pineal Res* 39:129–136.
- Flaten TP. 2001. Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull* 55:187–196.
- Golub MS, Germann SL, Han B, Keen CL. 2000. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150:107–117.
- Golub MS, Germann SL, Keen CL. 2003. Developmental aluminum toxicity in mice can be modulated by low concentrations of minerals (Fe, Zn, P, Ca, Mg) in the diet. *Biol Trace Elem Res* 93:213–226.
- Gómez M, Esparza JL, Nogués MR, Giralt M, Domingo JL. 2005. Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: Gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med* 38:104–111.
- Gómez M, Esparza JL, Cabré M, García T, Domingo JL. 2008. Aluminum exposure through the diet: Metal levels in AβPP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Toxicology* 249:214–219.
- Gonzalez MA, Alvarez Mdel L, Pisani GB, Bernal CA, Roma MG, Carrillo MC. 2007. Involvement of oxidative stress in the impairment in biliary secretory function induced by intraperitoneal administration of aluminum to rats. *Biol Trace Elem Res* 116:329–348.
- Gulcin I, Buyukokuroglu ME, Kufrevioglu OI. 2003. Metals chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J Pineal Res* 34:278–281.
- Gupta VB, Anitha S, Hegde ML, Zecca L, Garruto RM, Ravid R, Shankar SK, Stein R, Shanmugavelu P, Jagannatha Rao KS. 2005. Aluminum in Alzheimer's disease: Are we still at a crossroad? *Cell Mol Life Sci* 62:143–158.
- Hissin PJ, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226.
- Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, Laferla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y. 2008. Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res* 1216:92–103.
- Huang SM, Mouri A, Kokubo H, Nakajima R, Suemoto T, Higuchi M, Staufenbiel M, Noda Y, Yamaguchi H, Nabeshima T, Saido TC, Iwata N. 2006. Nephrilysin-sensitive synapse-associated amyloid-beta peptide oligomers impair neuronal plasticity and cognitive function. *J Biol Chem* 281:17941–17951.
- Kaneko N, Yasui H, Takada J, Suzuki K, Sakurai H. 2004. Orally administered aluminum-malatoate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J Inorg Biochem* 98:2022–2031.

- Karbownik M, Reiter RJ. 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 225:9–22.
- Kawahara M. 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimer Dis* 8:171–182.
- Kotler M, Rodríguez C, Sáinz RM, Antolín I, Menéndez-Peláez A. 1998. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 24:83–89.
- Lack B, Daya S, Nyokong T. 2001. Interaction of serotonin and melatonin with sodium, potassium, calcium, lithium and aluminum. *J Pineal Res* 31:102–108.
- Li D, Tang J, Xu H, Fan X, Bai Y, Yang L. 2008. Decreased hippocampal cell proliferation correlates with increased expression of BMP4 in the APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 18:692–698.
- Limson J, Nyokong T, Daya S. 1998. The interaction of melatonin and its precursors with aluminum, cadmium, copper iron lead and zinc. An adsorptive voltametric study. *J Pineal Res* 24:12–21.
- Liu P, Zheng Y, Smith PE, Bilkey DK. 2003. Changes in NOS protein expression and activity in the rat hippocampus, entorhinal and postrhinal cortices after unilateral electrolytic perirhinal cortex lesions. *Hippocampus* 13:561–571.
- López-Toledano MA, Shelanski ML. 2007. Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP (Sw, Ind). *J Alzheimer Dis* 12:229–240.
- Luo Y, Nie J, Gong QH, Lu YE, Wu Q, Shi JS. 2007. Protective effects of icariin against learning and memory deficits induced by aluminum in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:792–795.
- Maharaj DS, Glass BD, Daya S. 2007. Melatonin: New places in therapy. *Biosci Rep* 27:299–320.
- Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, Masters CL, Li QX, Bush AI. 2006. Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: Implications for Alzheimer beta-amyloid pathology. *J Inorg Biochem* 100:952–962.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59:1706–1713.
- Markesbery WR. 1997. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134–147.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. 1993. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 15:59–69.
- Moumen R, Ait-Oukhata N, Bureau F, Fleury C, Bougle D, Arhan P, Neuville D, Viader F. 2001. Aluminum increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 15:89–93.
- Musshoff U, Riewenherm D, Berger E, Fauteck JD, Speckmann EJ. 2002. Melatonin receptors in rat hippocampus: Molecular and functional investigations. *Hippocampus* 12:165–173.
- Nicotera TM, Notaro J, Notaro S. 1989. Elevate superoxide dismutase in Bloom's syndrome: A genetic condition of oxidative stress. *Cancer Res* 49:5239–5243.
- Nogués MR, Giralt M, Romeu M, Mulero M, Sánchez-Martos V, Rodríguez E, Acuña-Castroviejo D, Mallol J. 2006. Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 41:142–149.
- Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VMY. 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J* 16:1138–1140.
- Reiter RJ, Tan DX. 1998. Suppression of oxygen toxicity by melatonin. *Acta Pharmacol Sinica* 19:575–581.
- Reiter RJ, Tan DX. 2003. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 58:10–19.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 7:444–458.
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z. 2003. Melatonin as an antioxidant: Biochemical mechanism and pathophysiological implications in humans. A review. *Acta Biochim Pol* 50:1129–1146.
- Ribes D, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL. 2008. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 214:293–300.
- Rodrigo J, Fernandez-Vizcarra P, Castro-Blanco S, Bentura ML, Nieto M, Gomez-Isla T, Martinez-Murillo R, Martinez A, Serrano J, Fernandez AP. 2004. Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice. *Neuroscience* 128:73–89.
- Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. A minireview. *J Pineal Res* 36:1–9.
- Shcherbatykh I, Carpenter DO. 2007. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis* 11:191–205.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. 1993. Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrinol J* 1:57–60.
- Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. 2005. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res* 39:99–104.
- Wheeler C, Salzman J, Elsayed N. 1990. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184:193–199.
- Yokel RA, Allen DD, Alfrey DC. 1999. The distribution of aluminum into and out of the brain. *J Inorg Biochem* 76:127–132.
- Yokel RA, Florence RL. 2006. Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acid sodium aluminum phosphate, incorporated in to a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227:86–93.
- Yoo HY, Chang MS, Rho HM. 1999. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem* 274:887–892.
- Zang LY, Cosma G, Cardner H, Vallyathan V. 1998. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1425:469–477.

3. Protective role of melatonin on oxidative stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of A β PP transgenic mice after chronic exposure to aluminum

Authors: Tania Garcia, José L. Esparza, Montserrat Giralt, Marta Romeu, José L. Domingo, Mercedes Gómez
Biological Trace Element Research (2010); 135: 220-232

L'alumini (Al) s'ha associat amb diversos efectes prooxidants, així com, amb certes malalties neurodegeneratives com la malaltia d'Alzheimer. Per altre banda, la melatonina (Mel) és un conegut antioxidant que pot actuar directament com un neutralitzador de radicals lliures o indirectament al induir l'expressió d'alguns gens relacionats amb la defensa antioxidant. En aquest estudi, ratolins femelles transgènics per A β PP (Tg2576, Tg) i *wild-type* de 5 mesos d'edat van ser alimentats amb lactat d'Al a través de la dieta (1 mg Al/g dieta). Al mateix temps, els animals van rebre una dosi oral de Mel (10 mg/kg) fins al final de l'estudi als 11 mesos d'edat. Es van incloure quatre grups de tractament tan pels ratolins Tg com pels ratolins *wild-type*: Control, Al, Mel i Al+Mel. Al final del període de tractament, el còrtex i el cerebel van ser extrets i processats per examinar els diferents marcadors d'estrès oxidatiu: glutatió reduït (GSH), glutatió oxidat (GSSG), superòxid dismutasa Cu-Zn citosòlica (SOD1), glutatió reductasa (GR), glutatió peroxidasa, catalasa (CAT), i les substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric. A més, es va avaluar l'expressió gènica de la SOD1, GR i la CAT mitjançant una RT-PCR a temps real. Els canvis bioquímics observats en el còrtex i el cerebel van suggerir que l'Al podria actuar com a un possible agent prooxidant. La melatonina va exercir una acció antioxidant al incrementar els nivells d'mRNA de les enzimes SOD1, CAT, i GR en presència de Al+Mel, independentment del model animal.

Paraules clau: Alumini, melatonina, ratolins Tg2576, estrès oxidatiu, expressió gènica.

Protective Role of Melatonin on Oxidative Stress Status and RNA Expression in Cerebral Cortex and Cerebellum of A β PP Transgenic Mice After Chronic Exposure to Aluminum

Tania García · José L. Esparza · Montserrat Giralt ·
Marta Romeu · José L. Domingo · Mercedes Gómez

Received: 3 July 2009 / Accepted: 27 July 2009 /
Published online: 13 August 2009
© Humana Press Inc. 2009

Abstract Aluminum (Al) has been associated with pro-oxidant effects, as well as with various serious neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD). On the other hand, melatonin (Mel) is a known antioxidant, which can directly act as free radical scavenger, or indirectly by inducing the expression of some genes linked to the antioxidant defense. In this study, 5-month-old A β PP female transgenic (Tg2576) (Tg) and wild-type mice were fed with Al lactate supplemented in the diet (1 mg Al/g diet). Concurrently, animals received oral Mel (10 mg/kg) until the end of the study at 11 months of age. Four treatment groups were included for both Tg and wild-type mice: control, Al only, Mel only, and Al + Mel. At the end of the treatment period, cortex and cerebellum were removed and processed to examine the following oxidative stress markers: reduced glutathione, oxidized glutathione, cytosolic Cu–Zn superoxide dismutase (SOD1), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase, catalase (CAT), and thiobarbituric acid reactive substances. Moreover, the gene expression of SOD1, GR, and CAT was evaluated by real-time RT-PCR. The biochemical changes observed in cortex and cerebellum suggest that Al acted as a pro-oxidant agent. Melatonin exerted an antioxidant action by increasing the mRNA levels of the enzymes SOD1, CAT, and GR evaluated in presence of Al and Mel, independently on the animal model.

Keywords Aluminum · Melatonin · Tg2576 mice · Oxidative stress · Gene expression

T. García · J. L. Esparza · J. L. Domingo · M. Gómez (✉)
Laboratory of Toxicology and Environmental Health, IISPV, School of Medicine,
"Rovira i Virgili" University, Sant Llorens 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain
e-mail: mariamercedes.gomez@urv.cat

M. Giralt · M. Romeu
Pharmacology Unit, School of Medicine, "Rovira i Virgili" University, 43201 Reus, Catalonia, Spain

Introduction

Humans are exposed to aluminum (Al) from a number of different sources, including environment, foodstuffs, ingestion of antacids, dialysis, etc. This metal is also present in cookware, dust, and drinking water among other sources [1]. Aluminum salts are frequently used as coagulants to remove color and turbidity during water purification or treatment processes [2, 3]. It was shown that patients with chronic renal failure undergoing long-term hemodialysis accumulated Al in brain and other tissues [4].

Aluminum has been also implicated in serious neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD) [5–10]. AD is a neurodegenerative disorder defined by the presence of amyloid aggregates and neurofibrillary tangles. Accumulation of A β 1-42 and A β 1-40 in brain has been considered as the major factor involved in the development of AD, suggesting oxidative stress as one of the mechanisms related to β fragments neurotoxicity [11–14]. It has been also shown that A β toxicity in AD pathology is influenced by metal homeostasis disruption [13, 15–17]. Although the role of Al toxicity in AD is not clearly elucidated, it has been reported that Al enhances the activity of iron to cause oxidative damage [2, 18].

The possible mechanism of Al-induced neurotoxicity has been related to cell damage via free radical production. Increased lipid peroxidation is one of the major consequences of oxidative stress [8, 11–13, 19–21]. Mitochondrial dysfunction has been implicated in many neurodegenerative disorders associated with increased levels of free radicals and oxidative damage [21]. Moreover, it has been demonstrated that the brains of AD patients are damaged by reactive oxygen species (ROS) [22, 23]. It is also well known that the central nervous system (CNS) is highly vulnerable to attacks from ROS, which are due to the brain high oxygen consumption rate, the abundant lipid content, as well as the relatively low levels of antioxidant enzymes in comparison with other tissues [12, 13, 19, 23, 24].

Melatonin (Mel) is the main secretory product of the pineal gland. However, its production is not limited to this organ, being the endogenous Mel levels diminished with increasing age. This molecule has a wide range of endocrine, neural, and immune functions in the human body [2, 12, 13, 25–27]. It has been reported that Mel defends cells from a variety of oxidative events, being effective in preventing different types of degenerative disorders in which free radical generation is involved. It is well established that one of the earliest pathological events, secondary to oxygen free radicals injury, is oxidative damage and the generation of ROS by oxidative stress, which have an important role in provoking neural death [12, 26–28]. On the other hand, the expression of some enzymes, mainly related to the endogenous antioxidant system of the cell, such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), cytosolic Cu–Zn superoxide dismutase (SOD1), and nitric oxid synthase are under genomic regulation by Mel [29, 30]. In addition, Mel has been shown to influence antioxidant enzyme activity and cellular mRNA levels for these enzymes, both under physiological and elevated oxidative stress conditions [12, 13, 31].

AD, but also Parkinson's disease, has been linked to free radical-mediated degeneration of critical neurons in the CNS. Moreover, in all experimental models of these diseases, where Mel was examined to forestall neural loss and preserve function, it proved to be effective [32–34].

Nowadays, there are several genetically engineered AD mouse models. Tg2576 APPswe mice over-express a 695 amino acid splice form (Swedish mutation K670N M671I) of the human amyloid β precursor protein (APP₆₉₅). This animal model expresses high levels of the mutant amyloid-peptide (A β) in the cell body of neurons, neuronal loss, synaptic alterations, inflammation and gliosis, and the dendritic alterations, having a phenotype

characterized by memory deficits after 9–10 months of life. Although Tg2576 mice are currently considered as a suitable experimental model of AD [15, 16, 35–39], only a few studies have investigated the effects of Al in these animals [9, 15, 24, 40, 41]. In 2002, Pratico et al. [15] reported the effects of dietary Al administration (2 mg of Al/kg of diet) in Tg2576 mice. An increase of 8,12-*iso*-iPF_{2α}-VI levels in cortex and hippocampus was observed, while a relationship with Al content in brain was also noted.

The present investigation was aimed at assessing in cortex and cerebellum of Tg2576 female mice the oxidative imbalance induced after chronic dietary Al exposure. Another objective was to assess the ability of Mel to attenuate the Al effects, which was done by evaluating the protective role of Mel for regulating gene expression of some antioxidant enzymes.

Material and Methods

Chemicals

Aluminum, as Al lactate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), was administered through the diet. Regular chow was supplemented with 1 mg of Al per gram of chow (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) [40]. Melatonin was also purchased from Sigma Chemical.

Animals

AβPP transgenic mice were bred from a breeding pair of Tg2576 mice (Taconic Europe, Ejby, Denmark). An authorization from Taconic Europe was obtained for the cross-breeding. The Tg2576 colony was maintained by crossing Tg2576 males with C57BL6/SJL (wild-type) F1 females. At 2 months of age, the transgenic status was determined by polymerase chain reaction (PCR) of tail DNA. Females were then separated into transgenic and wild-type. Because of the aggressive behavior among males resulting in frequent injuries, only females were used. Animals (15–20 g) were housed in plastic cages in a climate-controlled facility with a constant day–night cycle (light, 08:00–20:00 hours) at a temperature of 22±2°C, and a relative humidity of 40–60%. Food and tap water were offered ad libitum throughout the study. The use of animals and the experimental protocol were approved by the Animal Care and Use Committee of the "Rovira i Virgili" University (Tarragona, Spain).

Treatment

At 5 months of age, treatments were initiated. One group of animals (control group) received regular chow (Panlab rodent chow, Panlab, Barcelona) and tap water. A second group of mice was given a supplement of Al lactate in the diet (1 mg of Al/g diet; Al group) [40, 42] and tap water. Animals treated with Mel received 10 mg/kg/day in the drinking water [43]. Melatonin was dissolved in absolute ethanol and added to the drinking water at a final ethanol concentration of 0.066% in feeding bottles protected from the light. Fresh Mel solutions were prepared twice a week. The experimental groups were distributed as follows: control wild-type (Control wild), control Tg2576 (Control Tg), Al wild-type (Al wild), Al Tg2576 (Al Tg), Mel wild-type (Mel wild), Mel Tg2576 (Mel Tg), Al + Mel wild-type (Al + Mel wild), and Al + Mel Tg2576 (Al + Mel Tg). Chow was replaced twice

per week until the end of the study at 11 months of age. Food consumption was measured during the first month of treatment. No differences in food intake between control and treated animals were found (data not shown).

Tissue Samples

At the end of the experimental period, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) dissolved in 0.9% saline. Subsequently, animals were decapitated and brains were removed. Each brain was placed on an ice-cold plate, and cerebral cortex and cerebellum were dissected. The dissection procedures required less than 3 min per animal. Twelve animals per group were used for evaluation of oxidative stress markers and gene expression. Six animals per group were utilized for determining Al concentrations.

Cerebral cortex and cerebellum samples were homogenized in 0.2 M cold sodium phosphate pH 6.25 buffer in a Potter-Elvehjem homogenizer fitted with a Teflon pestle. The crude soluble fraction was obtained after centrifugation at $105,000\times g$ for 1 h. The parameters below indicated were analyzed. The fresh crude soluble fraction was divided into two parts. The first one was precipitated with cold 70% trichloroacetic acid (final concentration 10%) and centrifuged. The supernatant was stored at -20°C in order to determine reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). The second fraction was aliquoted and stored at -20°C to determine cytosolic Cu-Zn superoxide dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and catalase (CAT) activities, as well as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein content [12, 13].

The cerebral cortex and cerebellum of six animals were also dissected, quickly frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C before being used for RNA isolation. Total cellular RNA was isolated from the samples using ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The purity and concentration of RNA were estimated by the relative absorbance at 260/280 nm determined in a GeneQuant II RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Cerebral cortex and cerebellum from six animals were processed to measure Al concentrations.

Biochemical Analysis

Protein content was determined by the Bradford method (1976) using bovine serum albumin (E. Merck, Darmstadt, Germany) as standard. SOD1, CAT, and GR activities, as well as TBARS contents, were determined as previously described [12]. GSH and GSSG were measured according to Hissin and Hilf [44] in a LS50 Perkin Elmer (Baconfield, UK) fluorimeter at 350 and 420 nm (excitation and emission wavelengths, respectively). Selenium-dependent and selenium-independent GPx activity was measured by the method of Wheeler et al. [45].

RT-PCR Real-Time Analysis

One microgram of total RNA was reversely transcribed to cDNA using random hexamers and MultiScribe Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions. For each sample, Cu-ZnSOD (SOD1, cytosolic), CAT, and GR mRNA expressions were quantified by real-time PCR with the use of an ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) combined with a

dual-label fluorogenic detection system (TaqMan) based on the 5' nuclease assay [46]. The detection system software calculates the ΔR_n using the equation $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, where R_n^+ is the fluorescence signal of the product at any given time and R_n^- is the fluorescence signal of the baseline emission. Primers and TaqMan probes for SOD1 (ref. Mm01344233_g1), CAT (ref. Mm00437992_m1), and GR (ref. Mm00833903_m1) were obtained from validated and pre-designed Assays-on-Demand products of Applied Biosystems, being used in real-time PCR amplifications. The 18s rRNA (ref. Hs99999901_s1) was used as endogenous control. The following cycle conditions in PCR reaction were used: 95°C for 10 min to activate the Taq Gold DNA polymerase and subsequently 40 cycles at 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. These reactions were performed in triplicate using 5 μ L of cDNA in a 25 μ L volume reaction. In this experiment, the untreated sample (control group) was defined as the calibrator. Therefore, the amounts of SOD1, GR, and CAT transcripts in the other samples were assigned dimensionless numbers relative to the levels in the calibrator sample.

Aluminum Analysis

Tissue samples were weighed in a microsampling quartz insert and 65% nitric acid (Suprapur, E. Merck) was added to digest the samples. The microsampling inserts were then introduced in Teflon vessels and put into a microwave oven Star D (Milestone, Sorisole, Italy). All materials were previously washed with 10% nitric acid to avoid any potential contamination. For quality control, brain reference standards (prepared in-house), and a standard reference material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA) were measured in each assay. Aluminum concentrations were determined by means of a computer-controlled sequential inductively coupled plasma spectrometer (Perkin Elmer Elan 600) according to DIN EN ISO 17294-2 [40]. Detection limit was 1.00 μ g/kg.

Statistics

Statistical analysis was performed using the software statistical package SPSS 12 (SPSS, Chicago, IL, USA). A univariate analysis of variance was performed using genotype (wild-type and transgenic), treatment (Control, Al, Mel, and Al + Mel), and their interactions as between-individuals fixed factors. According to this, differences between treatments within each genotype, or differences between genotypes within each treatment, were analyzed. Paired comparison, Scheffe test (as a post hoc test) was applied to determine the level of significance between groups. Results are given as mean values \pm standard deviation (SD). For all tests, the level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Table 1 summarizes Al concentrations in cortex and cerebellum of treated mice with Al or Mel, only or combined. In cortex, no significant Al accumulation in Al wild type and Al Tg groups was noted, while Al + Mel Tg and wild-type mice showed significant higher Al levels than animals exposed to Al only. However, cerebellum of Al wild type and Al Tg groups showed higher Al levels than those found in animals of the control group. Notwithstanding, the difference was only statistically significant in wild-type animals. In

Table 1 Concentrations ($\mu\text{g/g}$) of Aluminum in Cortex and Cerebellum of Mice Treated with Aluminum and/or Melatonin

	Cortex			
	Control	Al	Mel	Al + Mel
Wild	0.22 \pm 0.09 (a,1)	0.26 \pm 0.09 (a,1,2)	0.15 \pm 0.06 (a,1)	0.65 \pm 0.14 (b,3)
Tg2576	0.27 \pm 0.11 (a,1,3)	0.24 \pm 0.10 (a,1)	0.19 \pm 0.09 (a,1)	1.50 \pm 0.40 (b,2)
Cerebellum				
Wild	0.24 \pm 0.09 (a,1,3)	0.78 \pm 0.16 (b,2)	0.50 \pm 0.23 (a,b,1,2,3)	1.42 \pm 0.19 (c,4)
Tg2576	0.50 \pm 0.15 (a,1,2)	0.79 \pm 0.13 (b,2,3)	0.38 \pm 0.15 (a,c,1,2)	1.10 \pm 0.40 (c,3)

Results are expressed as mean ($\mu\text{g/g}$) values \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between animals of different genotype. Different numbers indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) when groups of animals of the same genotype were compared

the Al + Mel-treated group, Al concentration was, in both tissues, higher in Tg and in wild-type mice than in those of the control group.

The oxidative stress markers in cortex and cerebellum are presented in Tables 2 (cortex) and 3 (cerebellum). In cortex, when different genotypes were compared, the oxidative stress markers showed significant differences in GSSG and GR, but not in GSH, SOD1, CAT, TBARS, and GPx. TBARS concentrations increased in Al-treated groups in both Tg and wild-type animals, while the groups Al + Mel showed a decrease in Al concentration in comparison with Al-treated animals. However, this decrease was not statistically significant. In general, GSSG levels showed significant differences in both genotypes, wild-type, and Tg mice. In relation to GR levels, an increase in the Al-treated group and in Al + Mel group was noted in both genotypes in comparison with the control group. Finally, CAT levels were significantly higher in the Al + Mel Tg group than in the all Tg mice (Table 2).

When the different genotypes were compared in cerebellum, the oxidative stress markers showed significant differences in GSH, GPx, and SOD1, but not in TBARS, GSSG, GR, and CAT. GSH levels were higher in the Al + Mel group in wild-type animals. In contrast, this group showed lower levels in Tg mice. In relation to TBARS concentrations, a light increase in the Al group in relation to those in the control group, and a light decrease in the Al + Mel group in comparison to the Al only group were noted in wild-type mice. GSH levels decreased in the Al group and increased significantly in the Al + Mel group. However, this effect was only observed in wild-type animals. In Tg animals, GSH levels in the Al + Mel group decreased significantly in comparison with those in the Al and control groups (Table 3).

The relative mRNA levels of the antioxidant enzymes CAT, SOD1, and GR were quantified by real-time reverse transcription (RT)-PCR. The results in cerebellum and cortex are depicted in Fig. 1. The relative mRNA level of the control group was designated as one (1.0). In cortex, a significant overexpression of CAT, SOD1, and GR in Al plus Mel-treated Tg/wild-type groups was found. Aluminum-treated animals also showed a significantly overexpression of CAT in transgenic mice. On the other hand, a significant decrease in the relative expression of all the antioxidant enzymes was found in Mel-treated wild-type animals. In cerebellum, results also revealed an increase of all antioxidant enzymes in Al plus Mel groups, reaching for CAT the level of statistical significance in both Tg and wild-type mice, as well as in GR for Tg mice. A significant reduction in CAT mRNA levels was noted in Al Tg group. In general, the overexpression of CAT, GR, and SOD1 was several-fold higher in cortex than in cerebellum.

Table 2 Biochemical Oxidative Stress Markers in Cortex of Mice Treated with Aluminum and/or Melatonin

	Control wild	Al wild	Mel wild	Al + Mel wild	Control Tg	Al Tg	Mel Tg	Al + Mel Tg
Proteins (mg/g fresh tissue)	26.42±1.46	24.10±4.99	25.36±2.59	21.83±3.88	26.49±0.57	23.50±3.28	26.50±3.5	22.96±3.44
GSH (nmol/mg protein)	18.92±2.05	14.86±4.69	17.41±1.75	15.40±3.24	15.68±2.50	17.09±2.42	16.09±2.9	17.63±6.63
GSSG (nmol/mg protein)	3.84±0.37 (1,a)	5.78±1.92 (2,b)	3.84±0.62 (1,c)	8.59±5.33 (2,d)	6.13±1.87 (1,2,b,d)	4.60±0.97 (2,a,b,c)	3.90±0.29 (3,a,c)	6.91±2.07 (1,b,d)
SODI (U/mg protein)	18.68±3.91	15.80±5.88	21.18±4.09	16.45±6.45	16.29±4.34	23.40±15.20	24.33±9.69	26.58±10.11
CAT (μ mol/min/mg protein)	1.95±0.58	2.13±0.38	2.26±0.61	2.22±0.58	1.52±0.76 (1)	1.52±0.53 (1)	1.85±0.15 (1)	3.02±0.73 (2)
GR (mU/mg protein)	37±10.0 (1,d)	90±20.2 (2,c)	43±10.0 (1,d)	110±30.0 (2,b)	27±10.0 (1,a)	89±37.0 (2,b,c)	69±10.0 (2,c)	98±500 (3,c,b)
GPx (mU/mg protein)	20.17±1.33	21.33±4.8	23.4±4.83	30.33±8.62	20.80±2.95	22.33±3.83	21.00±2.83	27.86±11.85
TBARS (nmol/mg protein)	2.20±0.35	4.48±3.10	3.15±0.65	3.82±1.19	3.04±0.66	5.06±3.46	3.50±0.88	3.27±1.21

Results are expressed as mean values \pm SD. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between different genotypes. Different numbers indicate significant differences ($p < 0.05$) when groups of animals with the same genotype were compared

Table 3 Biochemical Oxidative Stress Markers in Cerebellum of Mice Treated with Aluminum and/or Melatonin

	Control wild	Al wild	Mel wild	Al + Mel wild	Control Tg	Al Tg	Mel Tg	Al + Mel Tg
Proteins (mg/g fresh tissue)	23.69±3.79 (1,a)	25.33±4.33	25.14±3.26	22.90±2.86	23.60±1.87	24.73±2.95	25.89±2.35	24.29±1.87
GSH (nmol/mg protein)	21.08±4.17 (1,a)	17.85±2.31 (1,a,b)	17.82±4.73 (1,a,b)	30.17±4.90 (2,c)	19.11±1.07 (1,a)	18.83±3.11 (1,a)	16.32±1.95 (1,2,a)	12.24±3.97 (2,b)
GSSG (nmol/mg protein)	16.75±3.80 (1)	12.09±3.37 (1,2)	11.68±2.47 (1,2)	10.22±3.73 (2)	14.80±1.60	15.91±3.0	13.53±2.09	14.45±3.97
SOD1 (U/mg protein)	31.53±9.31 (1,2,a)	22.56±5.20 (1,a)	22.80±3.19 (1,a)	36.08±4.11 (2,b)	29.53±4.12 (a,b)	23.58±6.24 (a,b)	20.52±3.02 (a)	29.51±6.75 (a,b)
CAT (µmol/min/mg protein)	4.73±0.75	5.36±1.55	3.42±1.67	4.38±1.46	4.23±0.88	3.42±1.11	4.33±1.03	4.68±1.13
GR (mU/mg protein)	169.18±34.48	150.47±14.99	142.35±19.04	162.35±47.31	153.23±30.84	170.89±25.89	138.66±35.25	156.40±43.22
GPx (mU/mg protein)	41.50±5.07 (a)	46.0±9.92 (c)	38.83±5.53 (a,b)	41.0±6.83 (a)	39.80±2.28 (1,a,b,c)	36.80±1.30 (2,b,c)	39.40±2.61 (1,a,b,c)	30.67±6.12 (2,b)
TBARS (nmol/mg protein)	0.68±0.13	0.79±0.13	0.54±0.40	0.73±0.06	0.68±0.15	0.69±0.14	0.78±0.17	0.90±0.18

Results are expressed as mean values ± SD. Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between different genotypes. Different numbers indicate significant differences ($p < 0.05$) when groups of animals with the same genotype were compared

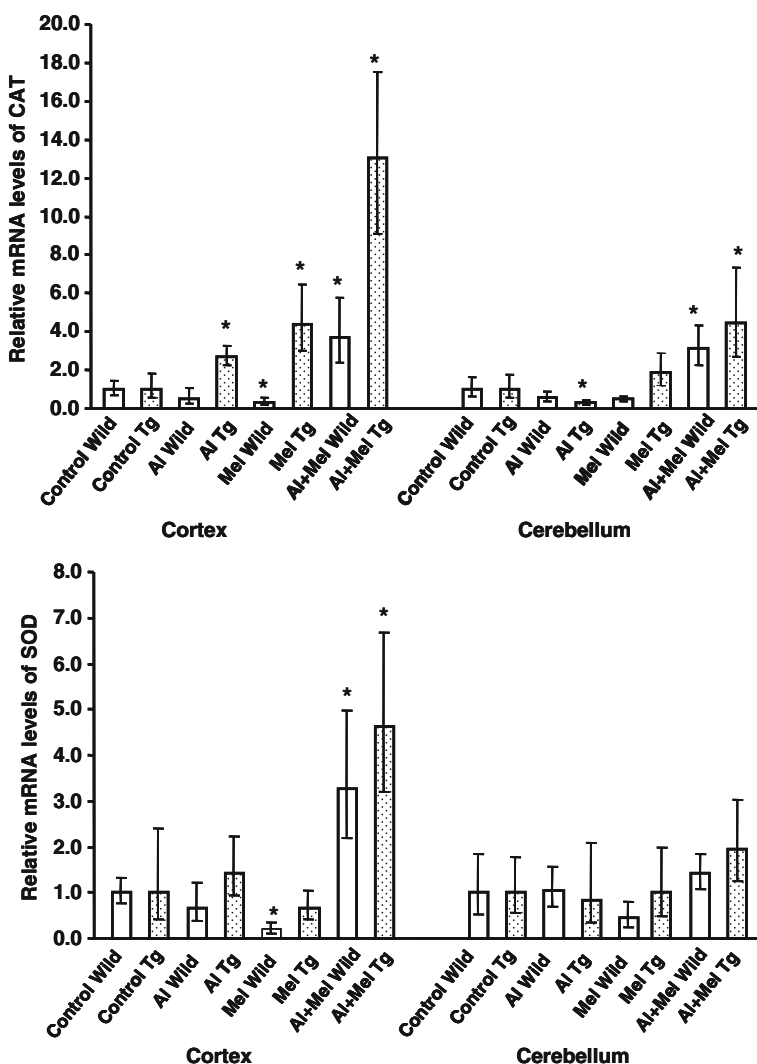


Fig. 1 Relative mRNA levels of CAT, SOD1, and GR in cortex and cerebellum from different treatments were calculated by means of the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ with $\Delta\Delta C_t + s$ and $DDC_t - s$, where s is the standard deviation of the $\Delta\Delta C_t$ value. An asterisk indicates significant differences with the respective control group ($p < 0.05$). Control groups were designed to be 1.0

Discussion

It is well known that in humans, most neurodegenerative diseases including AD, appear in the later stages of life, being due to the loss of specific neuronal populations, protein aggregation with formation of intracellular inclusion bodies, elevated oxidative stress, as well as metal alterations [47]. In the present study, wild-type and Tg2576 mice were fed with Al-supplemented chow during a period of 6 months (between 5 and 11 months of age). Aluminum-exposed groups did not show any reduction in body weight gain, in total brain weight, or deaths during the treatment.

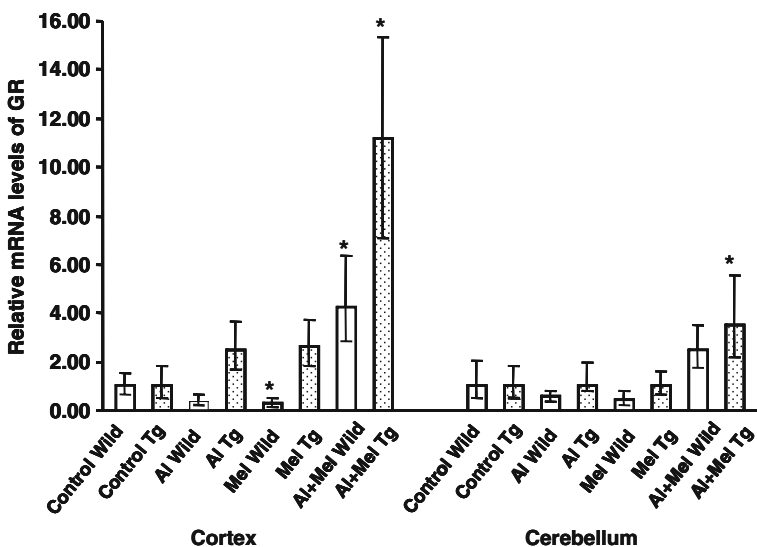


Fig. 1 (continued)

However, Al concentration in cortex and cerebellum increased in mice concurrently exposed to Al plus Mel. This is in agreement with the results of previous studies performed in our laboratory in Al-exposed rats, in which Mel administration did not reduce Al accumulation in different brain areas [12]. In previous investigations, we have shown that Al-exposed animals increased Al concentrations in whole brain, or in neural areas such as hippocampus, cortex, or cerebellum [13, 19, 40, 48]. Lack et al. [49] demonstrated that Mel might interact with a number of metal ions including Al, concluding that the chelation of metals by indolamines (such as Mel) could have important biological and pharmaceutical consequences. In the current investigation, while no detoxification effects of Mel were noted increased Al levels in the Al + Mel group were found in both genotypes studied.

In recent years, a number of studies have demonstrated that Al administration increased lipid peroxidation in brain of different species of animals, Tg mice [15], rats [12, 13, 19, 50], and rabbits [51]. In the present study, TBARS concentrations were slightly higher in Al-treated animals in cortex and cerebellum. However, this effect did not reach the level of statistical significance. TBARS concentration in cerebellum was lower than that found in cortex. It suggests that cerebral cortex, which is the most affected CNS region in the age-related neurodegenerative processes, is probably susceptible to lipid peroxidation during aging [52].

Melatonin and its metabolites are significant free radical scavengers. Melatonin can act as an indirect antioxidant through the activation of the major antioxidant enzymes including superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, and glutathione peroxidase [52, 53]. Moreover, Mel has been reported to be neuroprotective in a wide range of conditions affecting the CNS [52, 54–56]. In the present investigation, Mel acted as an antioxidant, increasing significantly GSH levels in cerebellum in wild-type animals, although the effect of Mel in cortex was not statistically significant. Recently, we also obtained similar results in studies with rats [12]. In relation to the antioxidant enzymes activities, no effects of Mel were noted in CAT activity in cerebellum. However, an increased activity was observed in cortex in both genotypes of animals evaluated, being significant only in Al + Mel Tg mice. A lack of

effect of Mel on the CAT activity was also recently reported in hippocampus of Al-treated Tg mice [24], while a significant increase of CAT activity in cortex and cerebellum was observed in rats treated with Al plus Mel [12].

Melatonin has been also implicated in the gene expression of enzymes involved in metabolizing ROS [12, 13, 24]. In the present study, the gene expression of three enzymes, CAT, GR, and SOD1, was investigated. Melatonin increased the expression of CAT, GR, and SOD1 in cortex of the animals treated with Al plus Mel in both genotypes studied. In cerebellum, the effect was similar, but lower than in cortex. A significant increase was only observed in CAT expression and in GR in cerebellum of Tg mice. Relative mRNA levels of SOD1, GR, and CAT increased in cortex and cerebellum of mice concurrently exposed to Al and Mel in relation to those in Al wild and Tg groups. In cortex, an overexpression of CAT, GR, and SOD1 several-fold higher was found. However, this increase does not corroborate, in general terms, the significant increase in CAT, GR, and SOD1 activities. It might be explained because post-transcription events such as translation or transport of gene products may be altered. This would result in a loss of functional molecules, minor post-translational changes, and finally, in a lack of changes on activity of these enzymes. Notwithstanding, the intracellular molecular pathways involved in the regulation of antioxidant enzyme gene expression and/or activity by Mel are still unknown [53].

Changes in the suprachiasmatic nuclei and the pineal gland are considered to be the neurobiological basis for the circadian disturbances in aging and AD. It is well known that Mel levels decrease on the course of normal aging, and even more dramatically in AD [46, 57]. In relation to this, the results of the current study, together with our recent findings in hippocampus of Tg 2576 female mice [24], suggest that Mel can protect in vivo against brain disorders in which ROS generation is particularly involved, such as AD. Neurotoxic adverse events might be prevented/diminished by reducing lipid peroxidation via direct free radical scavenging, and by inducing synthesis of new protein, with an upregulation in the gene expression of CAT, SOD1, and GR.

Acknowledgment Financial support for this study was provided by the “Fondo de Investigación Sanitaria” (FIS), Ministry of Health, Spain, through grant number PI050622.

References

1. Yokel RA, Florence RL (2006) Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acid sodium aluminum phosphate, incorporated in to a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227:86–93
2. Albendea CD, Gómez-Trullén EM, Fuentes-Broto L, Miana-Mena FJ, Millán-Plano S, Reyes-Gonzales MC, Martínez-Ballarín E, García JJ (2007) Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminum. *J Trace Elem Med Biol* 21:261–268
3. Tripathi S, Mahdi AA, Nawab A, Chander R, Hasan M, Siddiqui MS, Mahdi F, Mitra K, Bajpai VK (2009) Influence of age on aluminum induced lipid peroxidation and neurolipofuscin in frontal cortex of rat brain: a behavioral, biochemical and ultrastructural study. *Brain Res* 9:107–116
4. Bohrer D, Bertagnolli DC, de Oliveira SM, do Nascimento PC, de Carvalho LM, Garcia SC, Arantes LC, Barros EJ (2009) Role of medication in the level of aluminium in the blood of chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 24:1277–1281
5. Domingo JL (2006) Aluminum and other metals in Alzheimer's disease: a review of potential therapy with chelating agents. *J Alzheimers Dis* 10:331–341
6. Exley C, Esir MM (2006) Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminum in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:877–879
7. Walton JR (2006) Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 27:385–394

8. Yokel RA (2006) Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10:223–253
9. Drago D, Bolognin S, Zatta P (2008) Role of metal ions in the AB oligomerization in Alzheimer's disease and in other neurological disorders. *Curr Alzheimer Res* 5:500–507
10. Walton JR (2008) Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology* 30:82–193
11. Exley C (2004) The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic Biol Med* 36:380–387
12. Esparza JL, Gómez M, Nogués MR, Paternain JL, Mallol J, Domingo JL (2005) Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J Pineal Res* 39:129–136
13. Gómez M, Esparza JL, Nogués MR, Giralt M, Domingo JL (2005) Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med* 38:104–111
14. Di Carlo M (2009) Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J*. doi:10.1007/s00249-009-0439-8
15. Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VMY (2002) Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J* 16:1138–1140
16. Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, Masters CL, Li QX, Bush AI (2006) Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: implications for Alzheimer beta-amyloid pathology. *J Inorg Biochem* 100:952–962
17. Bush AI (2008) Drug development based on the metals hypothesis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 15:223–240
18. Xie PI, Yokel RA (1996) Aluminum facilitation of iron mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH and aluminum and iron concentrations. *Arch Biochem Biophys* 327:222–226
19. Esparza JL, Gomez M, Romeu M, Mulero M, Sanchez DJ, Mallol J, Domingo JL (2003) Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J Pineal Res* 35:32–39
20. Gupta VB, Anitha S, Hegde ML, Zecca L, Garruto RM, Ravid R, Shankar SK, Stein R, Shanmugavelu P, Jagannatha Rao KS (2005) Aluminum in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell Mol Life Sci* 62:143–158
21. Kumar V, Bal A, Gill KD (2008) Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminum. *Brain Res* 26:94–103
22. Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134–147
23. Kaneko N, Yasui H, Takada J, Suzuki K, Sakurai H (2004) Orally administered aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J Inorg Biochem* 98:2022–2031
24. García T, Esparza JL, Nogués MR, Romeu M, Domingo JL, Gómez M (2009) Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. *Hippocampus*. doi:10.1002/hipo.20612
25. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 7:444–458
26. Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP (2005) Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38:313–316
27. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R (2006) Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS J* 273:2813–2838
28. Reiter RJ, Korkmaz A (2008) Clinical aspects of melatonin. *Saudi Med J* 29:1537–1547
29. Liu P, Zheng Y, Smith PF, Bilkey DK (2003) Changes in NOS protein expression and activity in the rat hippocampus, entorhinal and postrhinal cortices after unilateral electrolytic perirhinal cortex lesions. *Hippocampus* 13:561–571
30. Maharaj DS, Glass BD, Daya S (2007) Melatonin: new places in therapy. *Biosci Rep* 27:299–320
31. Kotler M, Rodriguez C, Sáinz RM et al (1998) Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* 24:83–89
32. Matsubara E, Bryant-Thomas T, Pacheco Quinto J, Henry TL, Poeggeler B, Herbert D, Cruz-Sanchez F, Chyan YJ, Smith MA, Perry G, Shoji M, Abe K, Leone A, Grundke-Ikbal I, Wilson GL, Ghiso J, Williams C, Refolo LM, Pappolla MA, Chain DG, Neria E (2003) Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 85:1001–1008
33. Reiter RJ, Tan DX, Pappolla MA (2004) Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. *Ann N Y Acad Sci* 1035:179–196
34. Ma J, Shaw VE, Mitrofanis J (2009) Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat Disord* 15:307–314
35. Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, Younkin L, Good MA, Bliss TV, Hyman BT, Younkin SG, Hsiao KK (1999) Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2:271–276

36. Rodrigo J, Fernandez-Vizcarra P, Castro-Blanco S, Bentura ML, Nieto M, Gomez-Isla T, Martinez-Murillo R, Martinez A, Serrano J, Fernandez AP (2004) Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid-precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice. *Neuroscience* 128:73–89
37. Bizon J, Prescott S, Nicolle MM (2007) Intact spatial learning in adult Tg 2576 mice. *Neurobiol Aging* 28:440–446
38. López-Toledano MA, Shelanski ML (2007) Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP (Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 12:229–240
39. Duyckaerts C, Poitier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115:5–38
40. Gómez M, Esparza JL, Cabré M, García T, Domingo JL (2008) Aluminum exposure through the diet: metal levels in A β PP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Toxicology* 249:214–219
41. Ribes D, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL (2008) Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 214:293–300
42. Golub MS, Germann SL, Keen CL (2003) Developmental aluminum toxicity in mice can be modulated by low concentrations of minerals (Fe, Zn, P, Ca, Mg) in the diet. *Biol Trace Elem Res* 93:213–226
43. Nogués MR, Giral M, Romeo M, Mulero M, Sánchez-Martos V, Rodríguez E, Acuña-Castroviejo D, Mallol J (2006) Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 41:142–149
44. Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226
45. Wheeler C, Salzman J, Elsayed N (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184:193–199
46. ABI Prism 7700 (1997) Sequence detection system. User Bulletin No. 2. Revision A. Foster City, CA: Applied Biosystems
47. Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernández C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, Tolivia D, Gutierrez-Cuesta J, Pallas M, Camins A, Rodriguez-Colunga MJ, Coto-Montes A (2008) Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 45:302–311
48. Colomina MT, Roig JL, Sanchez DJ, Domingo JL (2002) Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology* 23:775–781
49. Lack B, Daya S, Nyokong T (2001) Interaction of serotonin and melatonin with sodium, potassium, calcium, lithium and aluminum. *J Pineal Res* 31:102–108
50. Candan N, Tuzmen N (2008) Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminum and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Neurotoxicology* 29:708–713
51. Abd-Elghaffar SKH, El-Sokkary GH, Sharkawy AA (2005) Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin. *Neuro Endocrinol Lett* 26:609–616
52. Akbulut KG, Gonül B, Akbulut H (2008) Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain Res* 1238:31–35
53. Rodríguez MI, Escames G, López LC, López A, García JA, Ortiz F, Sánchez V, Romeu M, Acuña-Castroviejo D (2008) Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol* 4:749–756
54. Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brío MI, Herrera F, Martín V, Rodríguez C (2002) Protective effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 943:163–173
55. Baydas G, Yasea A, Tuzcu M (2005) Comparison of impact of melatonin on chronic ethanol-induced learning and memory impairment between young and aged rats. *J Pineal Res* 39:346–352
56. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Cardinali D, Poeggeler B, Hardeland R (2006) Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav Brain Funct* 2:15
57. Wu YH, Swaab DF (2005) The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res* 38:145–152

4. Role of deferoxamine on enzymatic stress markers in an animal model of Alzheimer's disease after chronic aluminum exposure

Authors: José L.Esparza, Tania Garcia, Mercedes Gómez, M. Rosa Nogués, Montserrat Giralt i José L.Domingo.

Biological Trace Element Research (2010) en premsa

Es va avaluar l'efecte de la desferoxamina (DFO) sobre l'activitat de diferents marcadors d'estrès oxidatiu enzimàtics en els ratolins transgènics Tg2576, un model animal per la malaltia d'Alzheimer, després de l'exposició oral a alumini (Al) durant 6 mesos. Les femelles Tg2576 i de soca salvatge (C57BL6/SJL) o *wild-type* de 5 mesos d'edat van ser alimentades amb una dieta complementada amb lactat d'alumini (1mg Al/g menjar). Es van usar quatre grups d'animals per cada genotip (Tg2576/*wild*): Control, Al, DFO i Al+DFO. Els ratolins tractats amb DFO van rebre una injecció subcutània de 0,20 mmol/kg/d d'aquest quelant dos cops a la setmana fins al final del tractament, als 11 mesos d'edat. L'hipocamp, còrtex i cerebel dels animals van ser extrets i processats per examinar un cert nombre de marcadors d'estrès oxidatiu. A més, es va avaluar l'expressió gènica de la Cu-ZnSOD, GR i la CAT mitjançant una RT-PCR a temps real. Els nivells d'Al a l'hipocamp dels ratolins Tg2576 van ser superiors als trobats en còrtex i cerebel, així com els majors efectes oxidatius es van trobar en els animals tractats amb DFO. L'exposició oral a Al en els ratolins transgènics va promoure esdeveniments prooxidants, mentre que l'administració de DFO no ajudaria a prevenir aquests efectes nocius.

Paraules clau: Ratolins Tg2576, alumini, desferoxamina, estrès oxidatiu, enzims antioxidants, expressió gènica.

Role of Deferoxamine on Enzymatic Stress Markers in an Animal Model of Alzheimer's Disease After Chronic Aluminum Exposure

José L. Esparza · Tania Garcia · Mercedes Gómez ·
M. Rosa Nogués · Montserrat Giralt · José L. Domingo

Received: 13 April 2010 / Accepted: 22 April 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract The effect of the chelator deferoxamine (DFO) on the activity of enzymatic stress markers was assessed in amyloid beta peptide (A β PP) transgenic mice, an animal model of Alzheimer's disease, after oral aluminum (Al) exposure for 6 months. A β PP transgenic (Tg2576) and C57BL6/SJL wild-type mice of 5 months of age were fed a diet supplemented with Al lactate (1 mg of Al/g food). Four groups of Tg2576 and wild-type animals were used: control, Al only, DFO only, and Al plus DFO. Mice in the DFO-treated groups received also subcutaneous injections of 0.20 mmol/kg/d of this chelating agent twice a week until the end of the study at 11 months of age. The hippocampus, cerebellum, and cortex were removed and processed to examine a number of oxidative stress markers. Furthermore, the expression of Cu-Zn superoxide dismutase, glutathione reductase, and catalase was evaluated by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. Aluminum levels in the hippocampus of Tg2576 mice were higher than those found in cerebellum and cortex, while the main oxidative effects were evidenced in the presence of DFO only. Oral Al exposure of A β PP transgenic mice would have some potential to promote pro-oxidant events, while DFO administration would not help in preventing these deleterious effects.

Keywords Tg2576 mice · Aluminum · Deferoxamine · Oxidative stress · Antioxidant enzymes · Gene expression

J. L. Esparza · T. Garcia · M. Gómez · J. L. Domingo
Laboratory of Toxicology and Environmental Health, IISPV,
School of Medicine Universitat "Rovira i Virgili", Catalonia, Spain

M. R. Nogués · M. Giralt
Pharmacology Unit, School of Medicine, Universitat "Rovira i Virgili", Catalonia, Spain

J. L. Domingo (✉)
Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV,
"Rovira i Virgili University", Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain
e-mail: joseluis.domingo@urv.cat

Introduction

Aluminum (Al) is a well-known neurotoxic agent, which has been involved in neurodisorders such as Alzheimer's disease (AD) and other serious neurodegenerative diseases [1, 2]. Aluminum induces the production of free radicals leading to damage in lipids, proteins, and DNA in the brain [3–5]. The accumulation of free radicals may cause degenerative aging events including AD. A number of epidemiologic studies have suggested that Al might play a pathogenic role in AD [1, 6–8]. AD is a progressive neurodegenerative disorder that deprives cognitive function and is the most common cause of dementia in humans [9]. The neuropathologic characteristics of AD include cortical and subcortical atrophy, formation of intraneuronal neurofibrillary tangles, deposition of amyloid beta peptide (A β PP) in neuritic plaques or senile plaques, and formation of neurophil threads, loss of synaptic function, oxidative stress, and apoptosis, leading to neuronal loss [10–13]. These events are mainly observed in the hippocampal and cortical regions of AD brains.

The central nervous system is highly vulnerable to attacks from reactive oxygen species (ROS). This is due to the brain's high oxygen consumption rate and its abundant lipid content, as well as the relatively low levels of antioxidant enzymes in the brain in comparison with other tissues [11, 14–18]. It has been reported that the brain of AD patients is damaged by ROS [11, 19, 20].

On the other hand, deferoxamine (DFO) is an effective iron and aluminum chelator that has been widely used to facilitate Al removal in chronic Al overload in patients with end-stage renal failure under long-term dialysis [21–23]. In vitro, DFO is also a useful therapeutic tool in blocking ROS production [24]. Addition of DFO prior to exposure of astrocytes A β results in the suppression of ROS accumulation [25]. On the other hand, in vivo studies have shown that DFO inhibits lipid peroxidation and hydroxyl radical production associated with brain injury after hypoxic–ischemia-induced damage to different hippocampal brain structures [26]. DFO also exerts protective effects against oxidative brain injury after administration of amphetamine [27].

There are several genetically engineered AD mouse models that express high levels of the mutant A β in the cell body of neurons, neuronal loss, synaptic alterations, inflammation and gliosis, and dendritic alterations, all of which have a phenotype characterized by memory deficits after 9–10 months of life. The A β PP transgenic mouse (Tg2576, Tg) is currently considered as an experimental model of AD [28–34]. However, the results of only a few studies concerning Al effects in these animals have been reported [28, 33–37]. The aim of the present study was to analyze the ability of DFO to remove Al from various cerebral sections of A β PP transgenic mice that were chronically exposed to Al. This study also examined the protective antioxidant role of the chelating agent as a free radical scavenger. In addition, changes in a number of biochemical markers and expression of enzymes implicated in oxidative stress events were examined.

Materials and Methods

Animals and Diet

A β PP transgenic mice were bred from a breeding pair of Tg2576 mice (Taconic Europe, Ejby, Denmark). An authorization from Taconic Europe was obtained for the cross breeding. The Tg2576 colony was maintained by crossing Tg2576 males with C57BL6/SJL (wild type) F1 females. At 2 months of age, the transgenic status was determined by

polymerase chain reaction (PCR) of tail DNA. Female animals were then separated into transgenic and wild type. Only females were used in this study, because of the aggressive behavior among males, which results in frequent injuries. Animals (15–20 g) were housed in a room equipped with automatic light cycles (12-h light/dark) and maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and 40%–60% humidity. Food and tap water were offered ad libitum throughout the study. Regular chow (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) was supplemented with 1 mg of Al (as Al lactate) per gram of chow [36, 38]. The procedures used here were approved by the Ethics Committee of Animal Research, “Rovira i Virgili” University (Tarragona, Spain).

Chemicals

Aluminum lactate was purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Deferoxamine (DFO) was obtained from Novartis Farmacèutica, S.A. (Barcelona, Spain). Other reagents were of the highest quality available and obtained from commercial sources.

Treatments

To evaluate the differences on enzymatic stress markers and genotype oxidative response after oral Al exposure and subcutaneous DFO administration, A β PP transgenic (Tg2576) and C57BL6/SJL (wild-type) mice of 5 months of age were fed with chow supplemented with 1 mg of Al/g of food. Animals of both genotype (Tg and wild type) were divided into four groups of control, Al only, DFO only, and Al plus DFO. Animals in the DFO groups received subcutaneous injections of this chelator (0.20 mmol/kg/d) twice a week for 6 months [23]. At the end of the treatments, the hippocampus, cerebellum, and cortex were removed and processed to examine the following oxidative stress markers: reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), Cu-Zn superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Furthermore, the expression of SOD, GR, and CAT was evaluated by quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) analysis. Concentrations of Al in brain sections were also determined.

Tissue Samples

At the end of the experimental period, mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) dissolved in 0.9% saline. Animals were then decapitated and brains were removed. Each brain was placed on an ice-cold plate, and the hippocampus, cerebellum, and cortex were dissected. Twelve animals per group were used for evaluation of oxidative stress markers and gene expression, while six animals were used for determining brain Al concentrations. Samples were homogenized in 0.2 M cold sodium phosphate pH 6.25 buffer, in a Potter-Elvehjem homogenizer fitted with a Teflon pestle. The crude soluble fraction was obtained after centrifugation at $105,000 \times g$ for 1 h, and the parameters described were analyzed. The fresh crude soluble fraction was divided into two parts. The first one was precipitated with cold 70% trichloroacetic acid (TCA; final concentration 10%) and centrifuged. The supernatant was stored at -20°C in order to determine GSH and GSSG activity. The second fraction was aliquoted and stored at -20°C to determine the activity of SOD, GR, GPx, and CAT, as well as TBARS and protein content.

The hippocampus, cortex, and cerebellum of six animals were also dissected and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before being used for isolation of RNA. Total

cellular RNA was isolated from the samples using ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA). The purity and concentrations of RNA were estimated by the relative absorbance at 260 nm/280 nm determined by spectrometry (GeneQuan II; Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Finally, the hippocampus, cerebellum, and cortex of six animals were processed to measure Al concentrations.

Biochemical Analyses

Protein content was measured by the Bradford method [39] using bovine serum albumin as standard (E. Merck, Darmstadt, Germany). SOD, CAT, GPx, and GR activities, as well as TBARS content, were determined according to previously described methods [16]. GSH and GSSG were measured as reported by Hissin and Hilf [40] in a LS50 Perkin Elmer (Perkin Elmer, Baconfield, UK) fluorimeter at 350 and 420 nm (excitation and emission wavelengths, respectively). GPx activity was measured by the method of Wheeler et al. [41]. Both selenium-dependent and selenium-independent peroxidase activities were determined by this method.

Quantitative RT-PCR Analysis

One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA using random hexamers and MultiScribe Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's instructions. For each sample, SOD, CAT, and GR mRNA expression was quantified by real-time PCR with the use of an ABI Prism 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems) combined with a dual-label fluorogenic detection system (TaqMan) based on the 5'-nuclease assay. The detection system software calculates the ΔR_n using the equation $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, where R_n^+ is the fluorescence signal of the product at any given time and R_n^- is the fluorescence signal of the baseline emission. Primers and TaqMan probes for SOD (ref. Mm01344233_g1), CAT (ref. Mm00437992_m1), and GR (ref. Mm00833903_m1) were obtained from validated and predesigned Assays-on-Demand products of Applied Biosystems, being used in real-time PCR amplifications. The 18s rRNA (ref. Hs99999901_s1) was used as endogenous control. The following cycle conditions in PCR reaction were used: 95°C for 10 min to activate the Taq Gold DNA polymerase, and subsequently 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. These reactions were performed in triplicate using 5 μ L of cDNA in a 25- μ L volume reaction. For each sample, SOD, CAT, and GR mRNA levels were calculated by means of a comparative cycle threshold (Ct) method using $2^{-\Delta\Delta C_t}$, according to the manufacturer's instructions (ABI Prism 7700, 1997) [42]. The fold change in target gene transcripts relative to the endogenous control was determined by: fold change = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, where $\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ endogenous}})_{\text{treated group}} - (C_{t \text{ target}} - C_{t \text{ endogenous}})_{\text{control group}}$.

In this experiment, the untreated sample (control group) was defined as the calibrator. Therefore, the amounts of SOD, GR, and CAT transcripts in the other samples were assigned dimensionless numbers relative to the levels in the calibrator sample.

Aluminum Analysis

Samples of the brain tissues were weighed in a microsampling quartz insert, and 65% nitric acid (Suprapur; E. Merck) was added to digest the samples. The microsampling inserts were then introduced in Teflon vessels and put into a microwave oven Star D (Milestone,

Sorisolet, Italy) [36]. All materials were previously washed with 10% nitric acid in order to avoid any potential contamination. For quality control, brain reference standards (prepared in-house) and NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b; NIST, Gaithersburg, MD) were measured in each assay. Aluminum concentrations in cerebral tissues were determined by means of a computer-controlled sequential inductively coupled plasma spectrometer (Perkin Elmer Elan 6000) according to DIN EN ISO 17294-2. Detection limit was 1.00 µg/kg.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Chicago, IL). An univariate analysis of variance (ANOVA) was performed using genotype (wild-type and transgenic), treatment (control, Al, DFO, and Al+DFO), and their interaction as between-individuals fixed factors. According to this, differences between treatments within each genotype, or differences between genotypes within each treatment, were analyzed. Paired comparison and Scheffe test (as a post hoc test) were applied to determine the level of significance between groups. Results are given as mean values ± standard deviation (SD). For all tests, the level of statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

General Effects

In the wild-type animals, no deaths were observed during the treatment. However, 30% of animals died in the Al+DFO Tg group. Mice exposed to Al, DFO, or both, did not show significant differences in body weight gain in comparison with the respective control groups. No significant differences were observed in the weight of the whole brain in Tg2576 or wild-type animals when compared with the respective control mice (data not shown).

Aluminum Concentrations

The highest Al levels were found in the hippocampus, mainly, in the Al-exposed wild-type group. However, the differences reached statistical significance only in the Al-exposed Tg group. The cortex showed Al concentrations close to 10% of that observed in the hippocampus. Only the cerebella of Al-exposed wild animals showed a significant increase with respect to the corresponding control animals. However, an increase was not observed in the Al-exposed Tg group. The detected levels of Al are summarized in Table 1.

Biochemical Oxidative Stress Markers

There were no significant differences in the hippocampus levels of GSH, in CAT and SOD levels in the cerebellum, or in the levels of GSH, GSSG, and CAT in the cerebral cortex. On the other hand, a significant GSH increase was observed in the cerebellum of DFO-treated animals (wild), while lower concentrations were found in the cerebellum of the Al+DFO (Tg) groups, with no evidence of genotypic differences. However, GSH activity remained at normal values in the hippocampus of DFO-treated Tg mice. An increase of GSSG was observed in the hippocampus of both Al+DFO groups, while a decrease was noted in the

Table 1 Aluminum Levels in Hippocampus, Cortex, and Cerebellum of Tg2576 and Wild Mice Exposed to Aluminum, DFO, or Aluminum Plus DFO for 6 Months^a

	Control	Aluminum	DFO	Al plus DFO
Hippocampus				
Wild	1.99±0.65	3.07±0.75	2.67±0.93	2.54±0.74
Tg2576	1.43±0.29	2.70±0.66*	2.76 ± 1.14	2.33±0.46
Cortex				
Wild	0.22 ± 0.09	0.26±0.09	0.17±0.10	0.21 ± 0.14
Tg2576	0.27±0.11	0.24±0.10	0.24±0.08	0.23±0.11
Cerebellum				
Wild	0.24±0.09	0.78±0.16*	0.26±0.14	0.27±0.18
Tg2576	0.50±0.15	0.79±0.13	0.69±0.24	0.55±0.17

^aData are given as mean values ($\mu\text{g/g}$) \pm SD. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) between the same genotype

cerebellum of animals in the groups exposed to Al+DFO. CAT activity also decreased in hippocampus of Al+DFO groups, independently of the genotype of the animals. GR decreased in the hippocampus and cerebellum of DFO-treated wild-type animals, as well as in the cortex of DFO-exposed Tg mice, when compared with the respective genotypic group. In turn, GPx activity increased significantly in hippocampus and cortex of the DFO-exposed wild-type group. With respect to TBARS, DFO-treated wild mice showed an increase in the three cerebral tissues studied. Exposure to Al+DFO significantly increased the levels of TBARS in the hippocampus of animals in both genotypes compared with animals exposed to Al only (Figs. 1, 2 and 3).

mRNA Expression

The relative mRNA levels of the antioxidant enzymes SOD, CAT, and GR in the hippocampus, cortex, and cerebellum were quantified by RT-PCR (Figs. 4, 5 and 6). Increased levels of CAT mRNA were found in both DFO-treated groups (Al+DFO and DFO only) in the hippocampus, cortex, and cerebellum of wild-type animals. Only Al+DFO Tg mice showed increased levels of CAT mRNA expression in the three cerebral tissues. The expression of CAT also increased in the cortex of Al treated Tg mice. Similarly, a significant increase in the expression of GR mRNA was observed in the hippocampus and cortex in wild-type animals of both DFO-treated groups and in cerebellum of animals in the Al+DFO Tg group. In relation to mRNA levels of CAT, SOD, and GR, in the three cerebral sections studied, we observed several fold higher overexpression, but only in the DFO treated wild-type group in comparison with controls. These results show that concurrent exposure to Al and DFO significantly increased the levels of CAT and GR transcripts in both genotypes. The SOD mRNA level increased in all cerebral sections of DFO-exposed wild-type mice, but not either in Tg mice or in the Al plus DFO-treated animals.

Discussion

In this study, mice were fed with Al-supplemented chow during a period of 6 months (from 5 to 11 months of age). Two groups of animals received concurrently subcutaneous

HIPPOCAMPUS

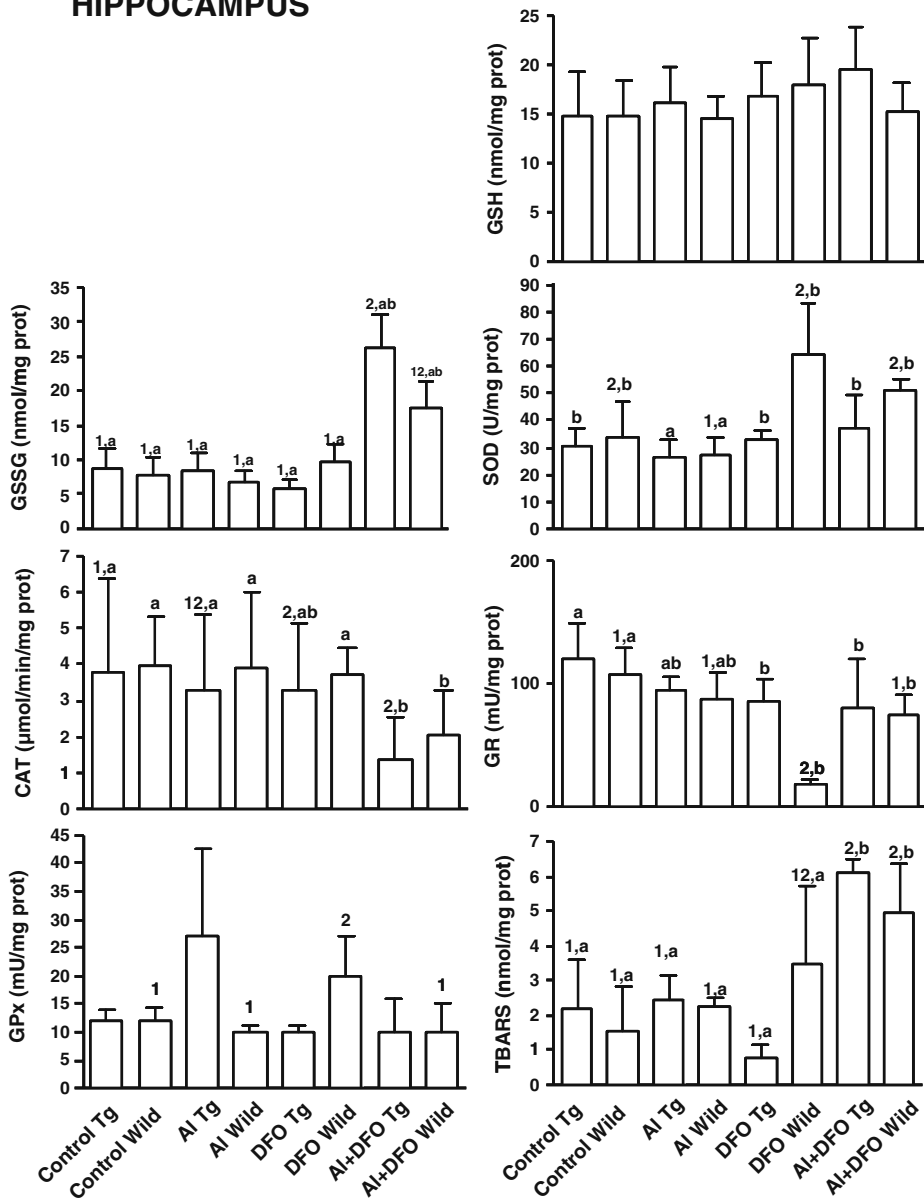


Fig. 1 Stress markers in hippocampus. Results are expressed as mean values \pm SD. Different numbers (1, 2) indicate significant differences when groups of the same genotype were compared (ANOVA/Scheffe). Different letters (a, b) indicate significant differences between different genotypes (ANOVA/Scheffe). The level of significance was established at $P < 0.05$

injections of DFO during the same period. Deaths occurred during the treatment in AI+DFO Tg mice (30%), while animals in the AI-exposed groups did not show any reduction in body weight gain or total brain weight. The highest levels of AI were found in the hippocampus, followed by the cerebellum and cortex. A number of previous studies

CORTEX

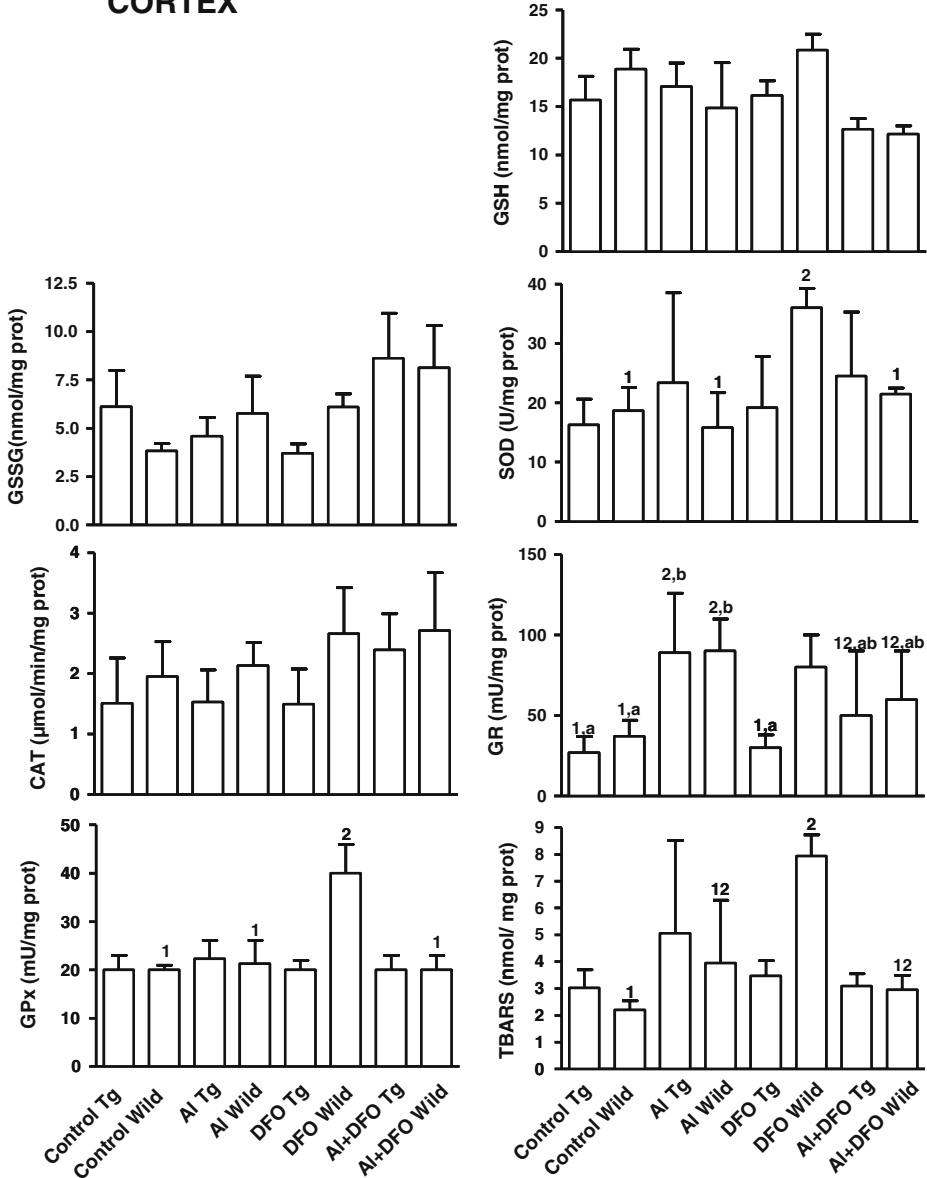


Fig. 2 Stress markers in cortex. Results are expressed as mean values \pm SD. Different numbers (1, 2) indicate significant differences when groups of the same genotype were compared (ANOVA/Scheffe). Different letters (a, b) indicate significant differences between different genotypes (ANOVA/Scheffe). The level of significance was established at $P < 0.05$

have shown that AI-exposed animals had increased AI concentrations in whole brain, or in neural areas such as the hippocampus [15, 17, 33, 36, 43]. In the present investigation, AI concentrations in hippocampus were very similar in wild-type and Tg2576 mice. However, higher AI levels were observed in AI-exposed wild-type animals than in AI-treated Tg mice.

CEREBELLUM

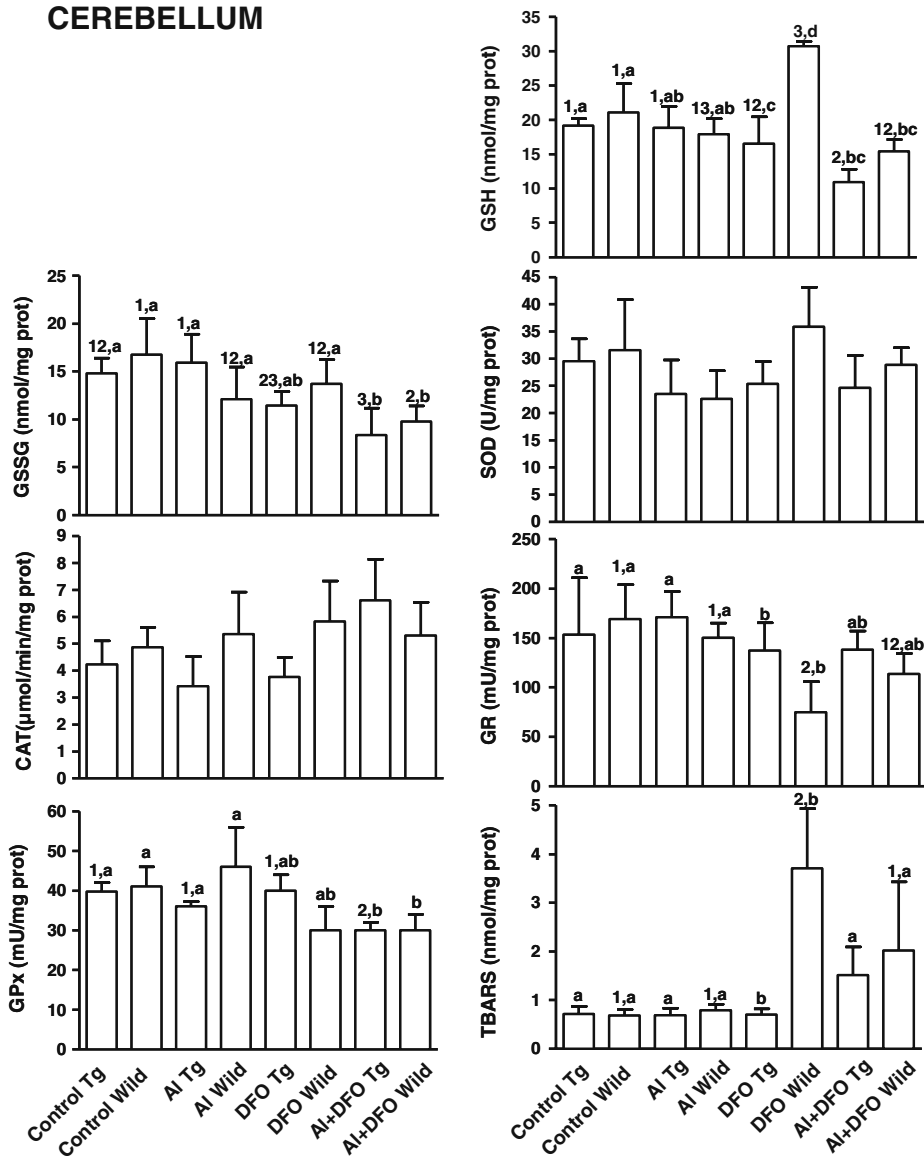


Fig. 3 Stress markers in cerebellum. Results are expressed as mean values \pm SD. Different numbers (1, 2) indicate significant differences when groups of the same genotype were compared (ANOVA/Scheffe). Different letters (a, b) indicate significant differences between different genotypes (ANOVA/Scheffe). The level of significance was established at $P < 0.05$.

Moreover, a significant Al increase was observed in the cerebellum of Al-exposed wild-type animals. Golub et al. [44] did not find an Al increase in the brain of mice after chronic exposure to this element given in supplemented chow (1 mg of Al/g of food). The differences might be explained by the fact that Al bioavailability from water (0.3%) is higher than that from chow (0.1%) [45].

HIPPOCAMPUS

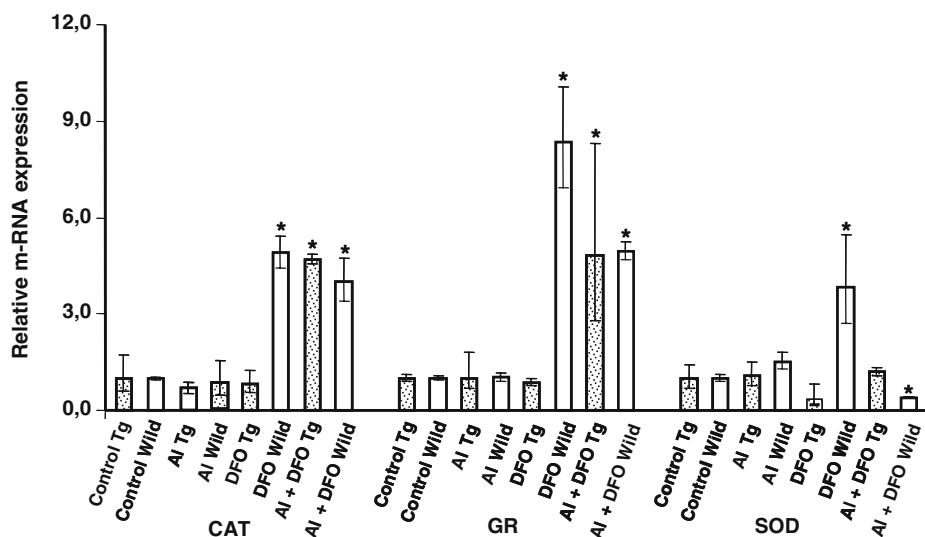


Fig. 4 Relative mRNA levels of CAT, SOD, and GR in hippocampus. Control groups were designed to be 1.0. The range given for CAT, SOD, and GR relative to control group was determined by evaluating the expression: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ with $\Delta\Delta Ct_{T+s}$ and $\Delta\Delta Ct_{T-s}$, where s is the standard deviation of the $\Delta\Delta Ct$ value. An asterisk indicates significant differences with the respective control group ($P < 0.05$)

CORTEX

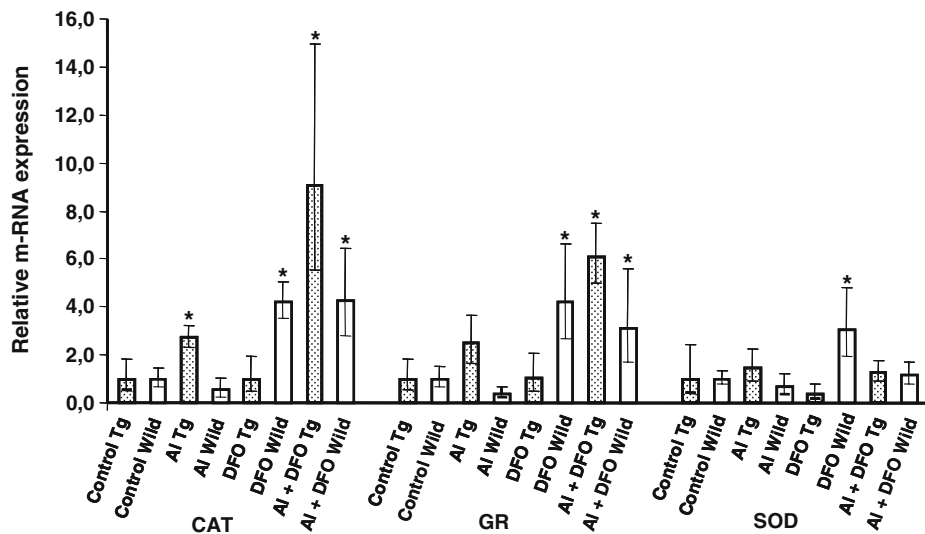


Fig. 5 Relative mRNA levels of CAT, SOD, and GR in cortex. Control groups were designed to be 1.0. The range given for CAT, SOD, and GR relative to control group was determined by evaluating the expression: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ with $\Delta\Delta Ct_{T+s}$ and $\Delta\Delta Ct_{T-s}$, where s is the standard deviation of the $\Delta\Delta Ct$ value. An asterisk indicates significant differences with the respective control group ($P < 0.05$)

CEREBELLUM

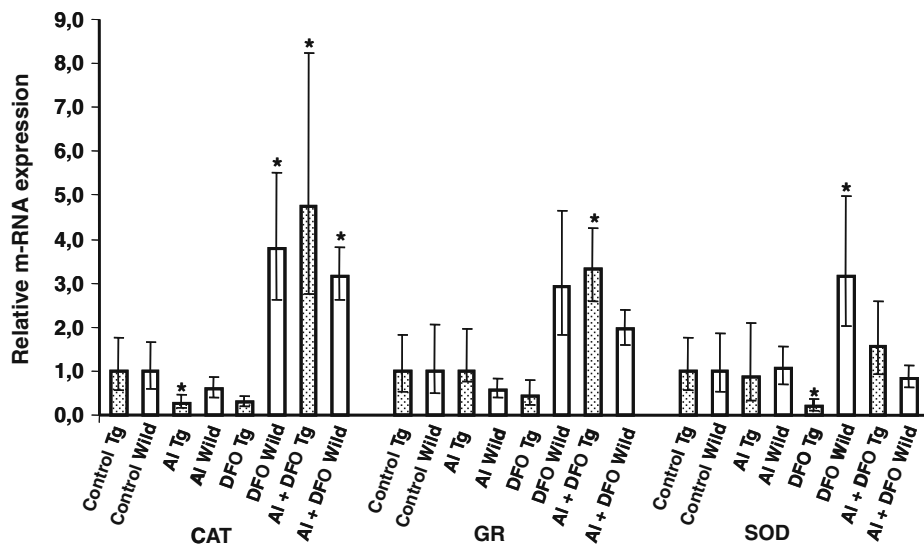


Fig. 6 Relative mRNA levels of CAT, SOD, and GR in cerebellum. Control groups were designed to be 1.0. The range given for CAT, SOD, and GR relative to control group was determined by evaluating the expression: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ with $\Delta\Delta Ct_{T+s}$ and $\Delta\Delta Ct_{T-s}$, where s is the standard deviation of the $\Delta\Delta Ct$ value. An asterisk indicates significant differences with the respective control group ($P < 0.05$)

A number of investigations have demonstrated that Al administration increases lipid peroxidation in the rat brain [28, 46, 47]. Animals experimentally exposed to Al commonly show a number of indicators of oxidative stress. These include changes in the levels of antioxidants such as GSH, SOD, and GR. However, no differences attributable to genotypic differences have been reported in the levels of GSSG, CAT, GPx, and biomarkers of lipid peroxidation such as TBARS [15, 48]. In the current study, the dose of Al given through the diet did not increase the levels of TBARS, as noted in previous studies in rats that were exposed to higher levels of this element [17].

One of the main consequences of the activation of the defense mechanisms is the neutralization of the oxidative agents. The overproduction of free radicals causes oxidative stress, a process that damages lipids, proteins, and other molecules, reducing their normal function. Enzymatic antioxidants are represented mainly by enzymes such as SOD, CAT, GPx, and GR. In addition, GPx and CAT participate in the removal of H_2O_2 [49]. GSH acts as a cellular reducing agent, its main function being to protect against oxidative stress and cellular aging. In the current study, after 6 months of Al exposure, the levels of GSH in the brain areas analyzed did not show any variation, with the exception of cerebellum, where GSH level decreased mainly in the DFO-treated Tg mice and in both the wild-type and Tg mice exposed to Al+DFO. On the other hand, GSH levels increased in the DFO treated wild-type mice. Interestingly, the lowest GSH level was detected in the cerebellum of mice in the Al plus DFO-treated Tg group. A number of authors have reported that DFO is able to reduce the neural damage by decreasing the level of oxidative stress [50, 51] and by enhancing the expression of genes encoding proteins in the glycolytic and hexose monophosphate shunt pathways, consequently providing a more reductive status [25]. Based on the results of the present study, we cannot corroborate this statement.

On the other hand, GR activity only decreased in the cerebellum and hippocampus of DFO-treated wild-type mice, but not in animals of the Al-exposed groups. By contrast, GR activity in the cortex increased in both genotype groups exposed to Al only, as well as in DFO-treated wild-type animals. A similar pattern was observed for SOD, which increased in hippocampus and cortex of DFO-treated wild-type mice. The current results do not show changes in the activity of GSSG in the cortex. However, higher values of GPx were found in the cortex and hippocampus of DFO wild-type animals. Contrary to our expectation, the levels of GPx were the lowest in the cerebellum of mice in the DFO-treated wild-type group. Moreover, only the hippocampus of Al plus DFO-treated wild-type and Tg animals showed a significant reduction in their CAT levels.

Antioxidant enzymes are regulated by multiple factors. Oxidative status of the cell is the primary factor regulating gene expression and activity of these enzymes [49]. Both endogenous [52] and exogenous [53] agents act as oxidants, altering cellular oxidative equilibrium and, consequently, the antioxidant enzyme gene expression. In the current study, relative mRNA levels of CAT and GR increased in the hippocampus, cortex, and cerebellum of mice concurrently treated with Al plus DFO and DFO-exposed wild-type animals. These results do not corroborate the notion that an increase in CAT or GR activity may correspond with an increase in their mRNA levels. A relationship between the gene expression of CAT and GR and the respective activity of these enzymes was not found. This could be explained by posttranscriptional events such as translation or transport of gene products, which may be altered. SOD expression increased in all cerebral areas assessed in the DFO-treated wild-type mice, demonstrating a correlation with the activity of this enzyme in these tissues.

In summary, the results of this investigation show that Al levels in the hippocampus of Tg2576 mice were higher than those found in the cerebellum and cortex. The main oxidative effects were evidenced in the presence of DFO only, predominantly in the cerebellum and cortex of the DFO-treated wild-type animals, and in hippocampus of mice in the Al plus DFO groups. The mRNA levels of all enzymes studied here were higher only in the DFO-treated wild-type mice. Thus, a direct correlation with their enzymatic activity was not noted. This overexpression was not observed in the Tg2576 groups. Based on the results of the present study, it can be concluded that oral Al exposure of A β PP transgenic mice could promote pro-oxidant events, while DFO administration would not help in preventing these deleterious effects in spite of the fact that an overexpression of some antioxidant enzymes has been observed. Further investigations using Tg animals to which DFO, as a possible antioxidant, is administered seem to be potentially interesting.

Acknowledgments Financial support for this study was provided by "Fondo de Investigación Sanitaria" (FIS), Ministry of Health, Spain, through grant number PI050622.

References

1. Kawahara M (2005) Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 8:171–182
2. Perl DP, Moalem S (2006) Aluminum and Alzheimer's disease, a personal perspective after 25 years. *J Alzheimers Dis* 9:291–300
3. Dua R, Gill KD (2001) Aluminium phosphide exposure: implications on rat brain lipid peroxidation and antioxidant defence system. *Pharmacol Toxicol* 89:315–319
4. Yousef MI (2004) Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology* 199:47–57
5. Bhalla P, Dhawan DK (2009) Protective role of lithium in ameliorating the aluminium-induced oxidative stress and histological changes in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 29:513–521

6. Behl C, Moosmann B (2002) Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33:182–191
7. Gillette Guyonnet S, Andrieu S, Vellas B (2007) The potential influence of silica present in drinking water on Alzheimer's disease and associated disorders. *J Nutr Health Aging* 11:119–124
8. Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF (2009) Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol* 169:489–496
9. Shcherbatykh I, Carpenter DO (2007) The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 11:191–205
10. Rohn TT, Rissman RA, Head E, Cotman CW (2002) Caspase activation in the Alzheimer's disease brain: tortuous and torturous. *Drug News Perspect* 15:549–557
11. Kaneko N, Yasui H, Takada J, Suzuki K, Sakurai H (2004) Orally administered aluminum-maltoate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J Inorg Biochem* 98:2022–2031
12. Gupta VB, Anitha S, Hegde ML, Zecca L, Garruto RM, Ravid R, Shankar SK, Stein R, Shanmugavelu P, Jagannatha Rao KS (2005) Aluminum in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell Mol Life Sci* 62:143–158
13. Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K, Niikura T, Hua F, Tsukagoshi-Nagai H, Horikoshi-Sakuraba Y, Mughal M, Rebeck GW, Laferla FM, Mattson MP, Iwata N, Saido TC, Klein WL, Duff KE, Aisen PS, Matsuoka Y (2008) Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res* 1216:92–103
14. Wei YH, Lee HC (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes. *Exp Biol Med* 227:671–682
15. Esparza JL, Gómez M, Romeo M, Mulero M, Sanchez DJ, Mallol J, Domingo JL (2003) Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J Pineal Res* 35:32–39
16. Esparza JL, Gómez M, Nogués MR, Paternain JL, Mallol J, Domingo JL (2005) Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J Pineal Res* 39:129–136
17. Gómez M, Esparza JL, Nogués MR, Giralt M, Domingo JL (2005) Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med* 38:104–111
18. Lee HC, Wei YH (2007) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* 232:592–606
19. Markesbery WR (1997) Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 23:134–147
20. De Felice FG, Vieira MN, Bomfim TR, Decker H, Velasco PT, Lambert MP, Viola KL, Zhao WQ, Ferreira ST, Klein WL (2009) Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of Abeta oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:1971–1976
21. Gómez M, Esparza JL, Domingo JL, Singh PK, Jones MM (1998) Comparative aluminum mobilizing actions of deferoxamine and four 3-hydroxypyrid-4-ones in aluminum-loaded rats. *Toxicology* 130:175–181
22. Gómez M, Esparza JL, Domingo JL, Singh PK, Jones MM (1999) Chelation therapy in aluminum-loaded rats: influence of age. *Toxicology* 137:161–168
23. Esparza JL, Gómez M, Domingo JL, del Castillo D, Hernández M (2000) Age-related differences on aluminum mobilization by chelating agents in aluminum-loaded uraemic rats. *Pharmacol Toxicol* 87:33–38
24. Guelman LR (2004) Deferoxamine antioxidant activity on cerebellar granule cells γ -irradiated in vitro. *Neurotoxicol Teratol* 26:477–483
25. Schubert D, Soucek T, Blouw B (2009) The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *Eur J Neurosci* 29:1323–1334
26. Papazisis G, Pourzitaki C, Sardeli C, Lallas A, Amaniti E, Kouvelas D (2008) Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res* 57:73–78
27. Valvassori SS, Petronilho FC, Réus GZ, Steckert AV, Oliveira VB, Boeck CR, Kapczinski F, Dal-Pizzol F, Quevedo J (2008) Effect of *N*-acetylcysteine and/or deferoxamine on oxidative stress and hyperactivity in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1064–1088
28. Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VMY (2002) Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J* 16:1138–1140
29. Hidalgo A, Burgos V, Viola H, Medina J, Argibay P (2006) Differential expression of glycans in the hippocampus of rats trained on an inhibitory learning paradigm. *Neuropathology* 26:501–507
30. Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, Masters CL, Li QX, Bush AI (2006) Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: implications for Alzheimer beta-amyloid pathology. *J Inorg Biochem* 100:952–962
31. López-Toledano MA, Shelanski ML (2007) Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP (Sw, Ind). *J Alzheimers Dis* 12:229–240

32. Duyckaerts C, Poitier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115:5–38
33. García T, Esparza JL, Nogués MR, Romeu M, Domingo JL, Gómez M (2010) Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminium. *Hippocampus* 20:218–225
34. García T, Esparza JL, Giralt M, Romeu M, Domingo JL, Gómez M (2010) Protective role of melatonin on oxidative stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of AbetaPP transgenic mice after chronic exposure to aluminum. *Biol Trace Elem Res*. doi:10.1007/s12011-009-8490-y
35. Drago D, Cavaliere A, Mascetra N, Ciavardelli D, Di Ilio C, Zatta P, Sensi SL (2008) Aluminum modulates effects of beta amyloid (1–42) on neuronal calcium homeostasis and mitochondria functioning and is altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation Res* 11:861–871
36. Gómez M, Esparza JL, Cabré M, García T, Domingo JL (2008) Aluminum exposure through the diet: metal levels in A β PP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Toxicology* 249:214–219
37. Ribes D, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL (2008) Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 214:293–300
38. Golub MS, Germann SL, Keen CL (2003) Developmental aluminum toxicity in mice can be modulated by low concentrations of minerals (Fe, Zn, P, Ca, Mg) in the diet. *Biol Trace Elem Res* 93:213–226
39. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
40. Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74:214–226
41. Wheeler C, Salzman J, Elsayed N (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 184:193–199
42. ABI Prism 7700, Sequence detection system (1997) User Bulletin No. 2. Revision A. Foster City (CA): Applied Biosystems
43. Colomina MT, Roig JL, Sanchez DJ, Domingo JL (2002) Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology* 23:775–781
44. Golub MS, Germann SL, Han B, Keen CL (2000) Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150:107–117
45. Yokel RA, Florence RL (2006) Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acid sodium aluminum phosphate, incorporated in to a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227:86–93
46. Luo Y, Nie J, Gong QH, Lu YF, Wu Q, Shi JS (2007) Protective effects of icariin against learning and memory deficits induced by aluminum in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34:792–795
47. Candan N, Tuzmen N (2008) Very rapid quantification of malondialdehyde (MDA) in rat brain exposed to lead, aluminum and phenolic antioxidants by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Neurotoxicology* 29:708–713
48. Moumen R, Ait-Oukhata N, Bureau F, Fleury C, Bougle D, Arhan P, Neuville D, Viader F (2001) Aluminum increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol* 15:89–93
49. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. A minireview. *J Pineal Res* 36:1–9
50. Youdim MB, Stephenson G, Ben Shachar D (2004) Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *N Y Acad Sci* 1012:306–225
51. Mee-Jung P, Sang-Ki L, Mi-Ae L, Hee-Sun C, Sung-Ig C, Choon-Gon J, Lee S-M (2006) Effect of alpha-tocopherol and desferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res* 1109:176–182
52. Nicotera TM, Notaro J, Notaro S (1989) Elevate superoxide dismutase in Bloom's syndrome: a genetic condition of oxidative stress. *Cancer Res* 49:5239–5243
53. Yoo HY, Chang MS, Rho HM (1999) The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J Biol Chem* 274:887–892

5. Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioural effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease

Authors: Tania Garcia, Diana Ribes, Teresa Colomina, Maria Cabré, José L. Domingo, Mercedes Gómez.

Toxicology (2009); 265(1-2): 49-55

En aquest estudi, ratolins femelles transgènics (Tg2576) i ratolins femelles *wild-type* de 5 mesos d'edat van ser exposats durant 6 mesos a lactat d'alumini (1 mg Al/g dieta), melatonina (10 mg/kg/dia), alumini més melatonina, o a cap tractament (grup control). Es va avaluar l'activitat motora general mitjançant la prova del camp obert (*open field*), mentre que l'aprenentatge i la memòria espacial es van avaluar mitjançant la prova del laberint d'aigua de Morris (*water maze*). Es van determinar els nivells d'alumini en l'hipocamp, còrtex i cerebel. Els ratolins Tg2576 tractats amb alumini van mostrar majors nivells d'alumini en l'hipocamp que els animals no tractats. No es va observar cap efecte de l'alumini sobre l'activitat motora general, mentre que la prova de camp obert va mostrar una major activitat vertical (*rearings*) per part dels ratolins transgènics. Tanmateix, es va observar una menor habituació en els animals tractats amb melatonina. La prova d'adquisició del *water maze* va mostrar diferències en la capacitat d'aprenentatge; els ratolins Tg2576 tractats amb alumini van presentar majors dificultats per aprendre la tasca en comparació amb els ratolins *wild-type* exposats a alumini. No es va trobar cap efecte significatiu de la melatonina en la prova d'adquisició. Aquests resultats indiquen que els ratolins Tg2576 són sensibles a altes dosis d'alumini a través de la dieta. No es va observar cap efecte protector per part de la melatonina davant dels efectes de l'alumini sobre el comportament.

Paraules clau: Alumini, melatonina, exposició oral, ratolins Tg2576, efectes cognitius.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicol

Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease

Tania García^{a,b}, Diana Ribes^a, Maria Teresa Colomina^a, María Cabré^b, José L. Domingo^a, Mercedes Gómez^{a,b,*}

^a Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, "Rovira i Virgili" University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain

^b Biochemical Unit, School of Medicine, IISPV, "Rovira i Virgili" University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2009

Received in revised form

15 September 2009

Accepted 16 September 2009

Available online 19 September 2009

Keywords:

Aluminum

Melatonin

Oral exposure

Tg2576 mice

Neurobehavioral effects

ABSTRACT

In this study, five months old female transgenic (Tg2576) and wild-type mice were exposed for 6 months to aluminum (1 mg Al/g diet), melatonin (10 mg/kg/day), Al plus melatonin, or vehicle only (control group). General motor activity was evaluated using an open-field, whereas spatial learning and memory were assessed in a water maze. Aluminum levels in hippocampus, cortex and cerebellum were determined. Aluminum-treated Tg2576 mice showed higher Al levels in hippocampus than non-Al treated animals. No Al effects on general motor activity were found, while the open-field test showed an increased number of rearings in Tg2576 mice. A lower habituation pattern was observed in melatonin-treated animals. Differences in learning were noted in the water maze acquisition test, in which Al-treated Tg2576 mice showed more difficulties in learning the task than Al-exposed wild mice. No significant effects of melatonin in the acquisition task were observed. The present results indicate that Tg2576 mice are sensitive to high dietary Al levels. A significant protector role of melatonin on Al-induced behavioral effects was not observed.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, a number of studies have investigated the potential role of various metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) (Domingo, 2006; Gaeta and Hider, 2005; Gómez et al., 2008). Alterations of Cu(II), Zn(II) and Fe(III) homeostasis in brain, and environmental exposure to certain metals can result in oxidative stress and contribute to the development of AD pathology (Gaeta and Hider, 2005; Kumar et al., 2009a,b). In 1965, Klatzo and co-workers reported the experimental induction of neurofibrillary tangles in rabbits after intracerebral injection of aluminum (Al) salts. Environmental exposure to Al was hypothesized to be related with the etiology and pathogenesis of AD. However, the involvement of Al exposure in this serious disease has been and still remains a controversial topic. In contrast to a number of studies indicating that Al might contribute to AD (Exley and Esiri, 2006; Ferreira et al., 2008; Krewski et al., 2007), other investigations did not find a direct link between Al and AD (Mizoroki et al., 2007).

AD is a neurodegenerative disease characterized by the presence of amyloid aggregates and neurofibrillary tangles, which involves a progressive mental deterioration manifested by cognitive impairments. The relationship between occupational Al exposure and the possible impairment of cognitive performance was recently assessed (Meyer-Baron et al., 2007). Some epidemiological studies indicate that occupational Al exposure can produce behavior impairments (Meyer-Baron et al., 2007; White et al., 1992), while other investigations did not find any relationship between occupational Al exposure and cognitive alterations (Iregren et al., 2001). In AD, it has also been shown that A β (amyloid beta peptide) toxicity is influenced by metal homeostasis disruption (Drago et al., 2008). In previous studies in rats, we found a significant relationship between Al exposure and the presence of oxidative stress (Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005). Investigations of other authors demonstrated that Al induced the formation of free radicals and promoted oxidative stress affecting cellular membranes (Exley, 2004; Kumar et al., 2009a,b). On the other hand, Praticò et al. (2002) observed an increase of isoprostane levels in hippocampus and cortex in a transgenic mouse model of AD exposed to Al through the diet. Moreover, studies in rats have shown cognitive impairments in learning and motor activity (Roig et al., 2006; Shi-Lei et al., 2005; Walton, 2007). In contrast, some investigations did not find significant behavioral effects related to Al exposure (Colomina et al., 2002). Recent studies have reported subtle behavioral effects

* Corresponding author at: Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, "Rovira i Virgili" University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain. Tel.: +34 977 759376; fax: +34 977 759322.

E-mail address: mariamercedes.gomez@urv.cat (M. Gómez).

related to developmental Al exposure (Colomina et al., 2005; Golub et al., 2003; Roig et al., 2006).

For several decades, experimental studies using rodent models have tried to establish a relationship between Al exposure and cognitive alterations. However, behavioral studies following oral Al exposure are rather complicated. Factors such as the high and variable concentration of Al in commercial grain-based laboratory animal diets, the low gastrointestinal Al absorption, differences in Al absorption depending on the age, and the animal model and behavioral procedure selected, contribute to found a great variability of results (Domingo et al., 1993; Garcia et al., in press; Golub et al., 2000; Golub, 2001; Yokel et al., 2001; Yokel and Florence, 2006; Sethi et al., 2008; Walton, 2009). Kaneko et al. (2006) reported that impairments of spatial memory in Al-exposed mice depended on the chemical form of the Al-administered compound. Aluminum uptake was higher in mice when Al was administered in a complex form. In relation to this, Al lactate has been often administered as a representative soluble Al salt with enhanced gastrointestinal absorption of this element (Golub et al., 2000). The administration route, the duration of the exposure, as well as the age and health of animals can also affect Al neurotoxicity.

Rodents (mouse and rat) are resistant to mimic neurodegenerative processes related to β -amyloid deposits. Nowadays, there are various genetically engineered mouse models more prone to neurodegeneration, which can be useful to elucidate the relationship between Al and AD. The amyloid precursor protein (A β PP) (SW) Tg2576 transgenic mouse expresses high levels of the mutant A β PP. The behavioral phenotype is characterized by spatial memory deficits after 9–10 months of life, which has been shown by altered performance in Y and Morris water mazes (King and Arendash, 2002; Hsiao et al., 1996; Morgan et al., 2000; Ribes et al., 2008). These behavioral alterations are correlated with the development of amyloid plaques in the frontal, temporal, and entorhinal cortex, as well as in the cerebellum (Rodrigo et al., 2004). These characteristics make this mouse model suitable for examining the relationship between Al exposure, A β deposition, and memory.

On the other hand, melatonin is a ubiquitous molecule with functional activity occurring in unicellular organisms, plants, fungi and in most vertebrates, including humans (Korkmaz and Reiter, 2008; Tan et al., 2007). Melatonin is synthesized primarily in the pineal gland being regulated by environmental light/dark cycle via suprachiasmatic nucleus. In addition to the use in treating jet lag and sleep disorders, melatonin participates in a number of physiological functions (Pandi-Perumal et al., 2006), being also an effective antioxidant, as free radical scavenging and up-regulates several antioxidant enzymes activity (Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005; Kilic et al., 2008). Melatonin is also effective in preventing different types of degenerative disorders in which free radical generation is involved (Kilic et al., 2004, 2008; Okatani et al., 2002). Moreover, this molecule can be protective in a number of pathological conditions including ischemia/reperfusion, inflammation, ionizing radiation and hypoxia (Hung et al., 2008). It has been also shown that melatonin inhibits A β -fibrillogenesis. Its cytoprotective properties have potential practical implications in the treatment of neurodegenerative disorders such as Parkinson, Huntington, and AD (Pandi-Perumal et al., 2006; Srinivasan et al., 2006). Furthermore, it has been reported that melatonin can bind essential and toxic metals as Al, cadmium, copper, iron, lead and zinc. It suggests a further role for melatonin in the reduction of free radical generation and metal detoxification (Limson et al., 1998).

Recently, Stackman et al. (2003) reported that Tg2576 transgenic mouse treated with antioxidants like *Ginkgo biloba* showed spatial memory retention comparable to wild-type mice, while non-treated transgenic mice evidenced memory impairments in a Morris water maze test. In turn, Quinn et al. (2007) demonstrated that α -lipoic acid could reduce hippocampal-dependent

memory deficits in Tg2576 mice. It suggests that administration of an antioxidant like melatonin could improve behavioral alterations in a transgenic mouse model for AD. Taking the above into account, the main goal of the present study was to assess if a high dietary dose of Al lactate given chronically to Tg2576 transgenic mice might accelerate the behavioral deficits observed in these animals. Moreover, the protective role of melatonin was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Aluminum, as Al lactate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), was administered through the diet. Regular chow was supplemented with 1 mg of Al per g of chow (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) (Gómez et al., 2008). Melatonin was also purchased from Sigma Chemical.

2.2. Animals and treatment

Adult Tg2576 and wild mice were used. Parental APPSWE hemizygous male mice were obtained from Taconic Europe (Lille Skensved, Denmark). Male mice were backcrossed with female (C57BL6/SJL) obtained from Charles River (Barcelona, Spain). At 2 months of age, animals were genotyped using mouse tail and separated according to the genotype. Mice were housed in an animal room at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, a relative humidity of $50 \pm 10\%$, and a 12-h light/dark automatic light cycle (light: 08.00–20.00 h). All animals were allowed free access to food and water.

At 5 months of age, transgenic and wild-type female mice received regular rodent chow, or rodent chow supplemented with Al lactate (1 mg Al/g of diet) during 6 consecutive months (Gómez et al., 2008). Melatonin-treated animals received 10 mg/kg/day of this pineal hormone through the drinking water (Nogués et al., 2006). Melatonin was dissolved in absolute ethanol and added to water in a final ethanol concentration of 0.066% in feeding bottles protected from the light. Control drinking water containing also 0.066% of ethanol as well. A fresh melatonin solution was prepared twice a week. Animals were divided into the following eight experimental groups: control wild, control Tg2576, aluminum wild (Al Wild), aluminum Tg2576 (Al Tg), melatonin wild (Mel Wild), melatonin Tg2576 (Mel Tg), aluminum plus melatonin wild (Al + Mel Wild), and aluminum plus melatonin Tg2576 (Al + Mel Tg).

After 6 months of Al exposure, mice were evaluated for behavior. Subsequently, they were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) dissolved in 0.9% saline. Animals were then decapitated and brains removed and dissected. Samples of hippocampus, cerebellum and cortex were obtained. The procedures used in the study were approved by the Ethics Committee of Animal Research, "Rovira i Virgili" University (Tarragona, Catalonia, Spain), and were carried out according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care.

2.3. Behavioral tests

At 11 months of age, 8 mice from each experimental group were used to evaluate cognitive alterations. Animals were weighed and assessed for general activity in an open-field. Spatial learning was also evaluated using a hidden platform version of the water maze.

2.3.1. Open-field test

The open-field apparatus consisted of a wooden $1\text{ m} \times 1\text{ m}$ square field surrounded by a 47 cm high dark wall. A 10 cm area near the surrounding wall was delimited and considered as the periphery. The rest of the open (more than 10 cm far from the wall) was considered as the center area. The distance travelled, the ratio distance in center/total distance travelled and the time in the center of the open-field were analyzed as a measure of anxiety-like behavior (DeFries et al., 1974). During the test, mice were allowed to move freely around the open-field and to explore the environment for 15 min.

The path of the animals was recorded by a video camera (Sony CCD-IRIS model), which was placed above the square and connected to a VHS videocassette recorder (Panasonic AG-5700 model). The video tracking program Etho-Vision[®] from Noldus Information Technologies (Wageningen, The Netherlands) was used to measure the time spent in each area, the total distance traveled as a measure of horizontal activity, and the number of rearings as a measure of vertical activity.

2.3.2. Morris water maze

Two days after examining general motor activity, spatial learning was evaluated. The maze consisted of a circular tank (diameter: 1 m, height: 0.60 m) and an escape platform located 1 cm below the water surface and at the center of one of the four quadrants of the maze. Extra-maze cues were placed around the pool to provide a spatial configuration of the task. Mice were exposed to one training session per day during 5 days. Each training session consisted of four trials separated by a 60 s intertrial period. At the beginning of each trial, the mouse was placed into the pool with its nose pointing towards the wall from one of the four starting positions. These

starting positions were randomly varied between trials. The maximum duration of each trial was 60 s. Animals failing to reach the platform during the fixed period were conducted to it by the researcher, remaining there for 30 s. Four hours after the last training session, retention of the task was assessed by a probe trial, which consisted of a 60 s free swim without the escape platform. Animal performance was recorded by a video camera placed above the maze. Data were analyzed by the video tracking program Etho-Vision®. The swim-path length, the latency to find the escape platform during the training sessions, as well as the total time and the percentage of time spent by the mouse swimming in the target quadrant for the probe trial, were measured as indicators of water maze performance. Results from trials for each day were averaged for every mouse.

2.4. Aluminum concentrations

Brain samples (hippocampus, cerebellum and cortex) from 5 animals of each experimental group were used to determine Al levels. Sample tissues were weighted in a microsampling quartz insert, and 0.5 mL of 65% nitric acid (Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) were added to digest the sample. The microsampling inserts were introduced in Teflon vessels, which were placed into a microwave oven Star D of Milestone (Sorisole, Italy) during 30 min at 185 °C and 1000 W according to the manufacturer's instructions. The digested sample was then diluted at 5 mL with milli-Q water. All materials were previously washed with 10% nitric acid in order to avoid sample contamination. For quality control, brain reference standard (prepared in-house) and NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA) were measured in each assay. Aluminum concentrations were determined by means of a computer-controlled sequential inductively coupled plasma spectrometer (PerkinElmer 6000) (Gómez et al., 2008).

2.5. Statistics

All data were analyzed using the software Statistical Package for the Social Sciences SPSS (version 15). Behavioral data were analyzed with a three-way ANOVA (genotype \times melatonin \times Al), and with a three-way ANOVA for repeated measures, using the period of time as the repeated measure, and genotype and treatment as factors. Differences in Al concentrations were analyzed with a two-way ANOVA (genotype \times treatment). The homogeneity of the variances was analyzed by the Levene test and a one-way ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. If the variances were not homogenous, the non-parametric Kruskal–Wallis test and the Mann–Whitney *U*-test were used. A probability value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

3. Results

No significant effects of treatment or genotype were found on body weight gain. However, the weights of Tg2576 animals were always lower than those of wild-type mice, independently on the specific treatment (data not shown). No general adverse effects of any treatment were observed.

3.1. Behavioral test

The general activity in an open-field was analyzed by a three-way ANOVA (genotype \times Al \times melatonin). Total distance traveled (horizontal activity) and total numbers of rearings (vertical activity) were evaluated. A significant overall effect of the genotype was observed in the total number of rearings [$F(1, 63) = 3.995$, $p = 0.050$] (Fig. 1A), indicating that transgenic mice performed significantly higher number of rearings than wild-type animals. However, no effects of Al, melatonin, or interactions between both were detected. To evaluate habituation to the novel environment, the 15 min exploration period was divided in fractions of 5 min. A three-way ANOVA (genotype \times Al \times melatonin) for repeated measures was performed to assess changes in horizontal activity over time. A significant effect of time [$F(2, 63) = 12.541$, $p < 0.001$] indicated all groups habituated to the novel environment. A significant interaction between Al and time [$F(2, 63) = 3.454$, $p = 0.039$] was also found, suggesting different habituation patterns between Al-exposed and non-exposed mice. A more detailed data analysis showed significant differences between groups in the second period of time (5–10 min.), [$\chi^2 = 17.179$, $df 7$, $p < 0.05$] (Fig. 1B), being control wild-type mice the least active group during this period.

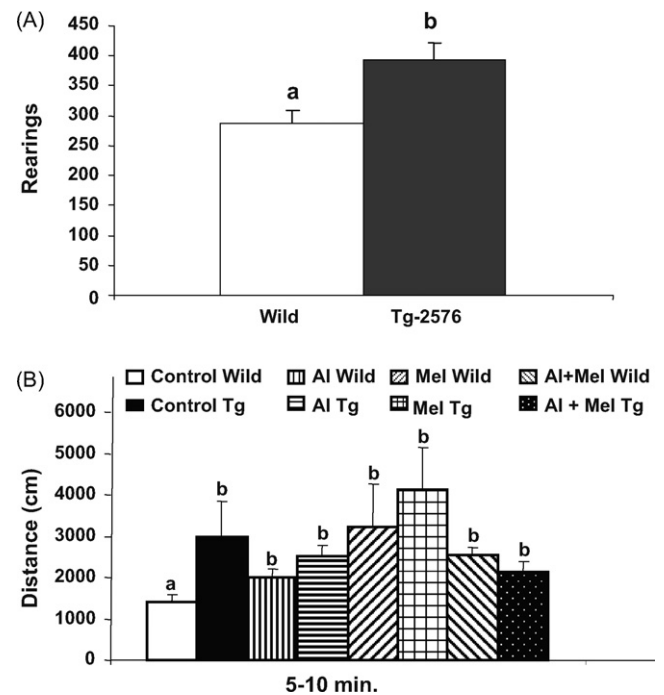


Fig. 1. Number of total rearings in an open-field (A), and total distance traveled in 5–10 min period (B). Data are expressed as mean values \pm SEM. Different superscripts (a and b) indicate significant differences ($p < 0.05$) according to genotype (A) or between groups (B).

The ratio total distance traveled in the center/total distance traveled in the open-field was also measured. No general effects of Al or genotype on this ratio were found. However, a significant overall effect of melatonin could be noted [$F(1, 63) = 6.295$, $p = 0.015$], showing melatonin-treated animals traveled more distance in the center than animals non-exposed to melatonin (Fig. 2). Anyhow, no significant overall effects of melatonin on the time spent in the center of the open-field were found.

To assess acquisition in the water maze, latency and distance to platform measurements were averaged for each day. A three-way ANOVA (genotype \times melatonin \times Al) for repeated measures was performed. A significant effect of factor day on latency [$F(4, 63) = 50.470$, $p < 0.001$] and on total distance traveled [$F(4, 63) = 36.779$, $p < 0.001$] during the acquisition period indicated that all the animals improved their ability to find the platform over days during the acquisition period. No significant overall effects of Al or melatonin on latency or total distance traveled were found. Also,

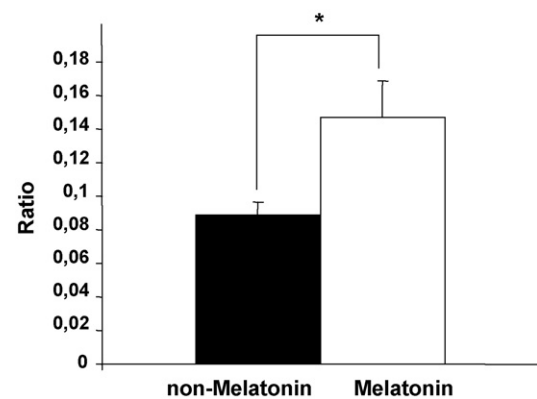


Fig. 2. The ratio of center distance to total distance traveled in the open-field. Data are expressed as mean values \pm SEM. An asterisk indicates significant differences at $p < 0.05$.

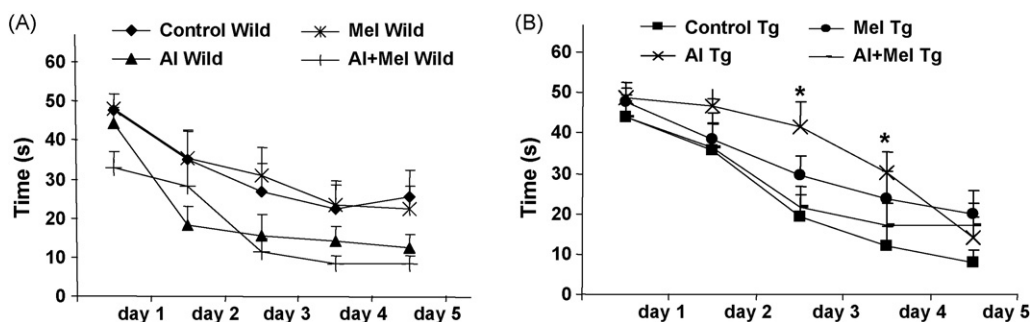


Fig. 3. Daily escape latencies of wild (A) and Tg2576 (B) mice exposed to Al and melatonin. Data are mean values \pm SEM.

no significant effect of genotype was noted. However, a significant interaction between genotype and Al on latency could be observed [$F(1, 63) = 8.084, p = 0.006$], suggesting different learning patterns of Al-treated and non-treated animals according to the genotype. For this reason, genotype and treatment were separately analyzed. No significant differences between Al-treated and non-treated wild mice were found. However, significant differences between non-treated and Al-treated transgenic mice were observed on days 3 [$F(1, 15) = 8.817, p = 0.010$] and 4 [$F(1, 15) = 6.843, p = 0.020$], showing that Al impairs learning in transgenic mice. In order to evaluate the effect of melatonin on the acquisition of the task, the latency to the platform of control and Al-treated mice was compared to melatonin-treated animals. A remarkable effect of melatonin was not found (Fig. 3A and B). Retention of the task was evaluated 4 h after the acquisition period. Although no significant effects of Al or melatonin were noted, an overall effect of the genotype on the distance traveled [$F(1, 63) = 9.118, p = 0.004$] was detected in the target quadrant. All groups of transgenic mice showed a higher total distance traveled in the target quadrant than animals in the remaining groups. However, no significant effects on the time spent in the target quadrant were found (Fig. 4A and B).

3.2. Aluminum concentrations

Concentrations of Al were determined in hippocampus, cerebellum and cortex. In general terms, Al concentrations in all tested animals were higher in hippocampus than in cerebellum or cortex. To compare differences between groups, a one-way ANOVA was performed. In hippocampus, Al levels of Tg2576 mice exposed either to Al or Al + Mel, were significantly higher than those found in the control transgenic group (Fig. 5A). In cerebellum of both transgenic and wild-type Al-treated mice, higher Al levels than those found in animals of the control group were noted (Fig. 5B). Finally, Al levels in cortex of Al + Mel transgenic and wild-type mice showed significant higher levels of Al than animals exposed to Al only (Fig. 5C).

4. Discussion

Aluminum is a non-essential metal with pro-oxidant properties, as well as capacity to alter $A\beta$ processing and to facilitate $A\beta$ aggregates (Domingo, 2006; Praticò et al., 2002). In recent decades, Al neurotoxicity and its possible impairment of cognitive performance have been extensively studied. On the other hand, melatonin has been shown to possess antioxidant and protector properties, which have been also demonstrated for Al-induced pro-oxidant effects (Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005; Lahiri et al., 2004). Some recent data indicate that antioxidants can reduce hippocampal-dependent memory deficits in Tg2576 mice (Quinn et al., 2007). Melatonin has been also suggested to possess a role as a chelating agent for some metals, including Al (Limson et al., 1998). Both properties could ameliorate Al-induced behavioral deficits. In the present study, behavioral effects of a high oral Al dose (1 mg Al/g diet) given during a chronic exposure period (6 months) were investigated in adult transgenic (Tg2576) mice. The potential melatonin protection properties against Al adverse effects were also evaluated.

The current results did not show Al effects in wild-type or Tg2576 mice on body weight gain, which is not in accordance with the results of previous studies where Al exposure caused adverse effects on body weight gain of mice (non-transgenic) (Golub, 2001). In a recent investigation, we found an increase in Al levels in hippocampus of Tg2576 mice exposed to Al through the diet (Gómez et al., 2008). In turn, Praticò et al. (2002) reported an increase of isoprostane levels in hippocampus and cortex of Tg2576 mice treated with 2 mg Al/kg of diet, and an increase in Al concentrations in brain. However, no data on Al concentrations in cerebral sections were reported. In the present study, no chelating effects of melatonin administration in hippocampus, cerebellum or cortex of Al-treated mice were found. In contrast, increased levels of Al in cortex of transgenic and wild-type mice exposed to Al plus melatonin could be noted. These results are not in agreement with those of previous studies showing some interaction between melatonin and aluminium *in vitro* (Lack et al., 2001; Limson et al., 1998).

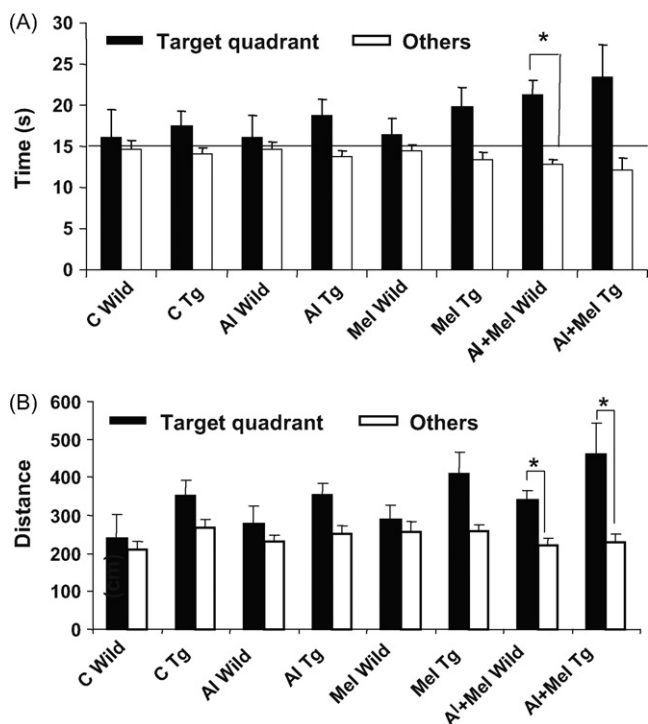


Fig. 4. Time spent (A) and total distance traveled (B) in target quadrant. Data are mean values \pm SEM. An asterisk indicates significant differences ($p < 0.05$) between groups.

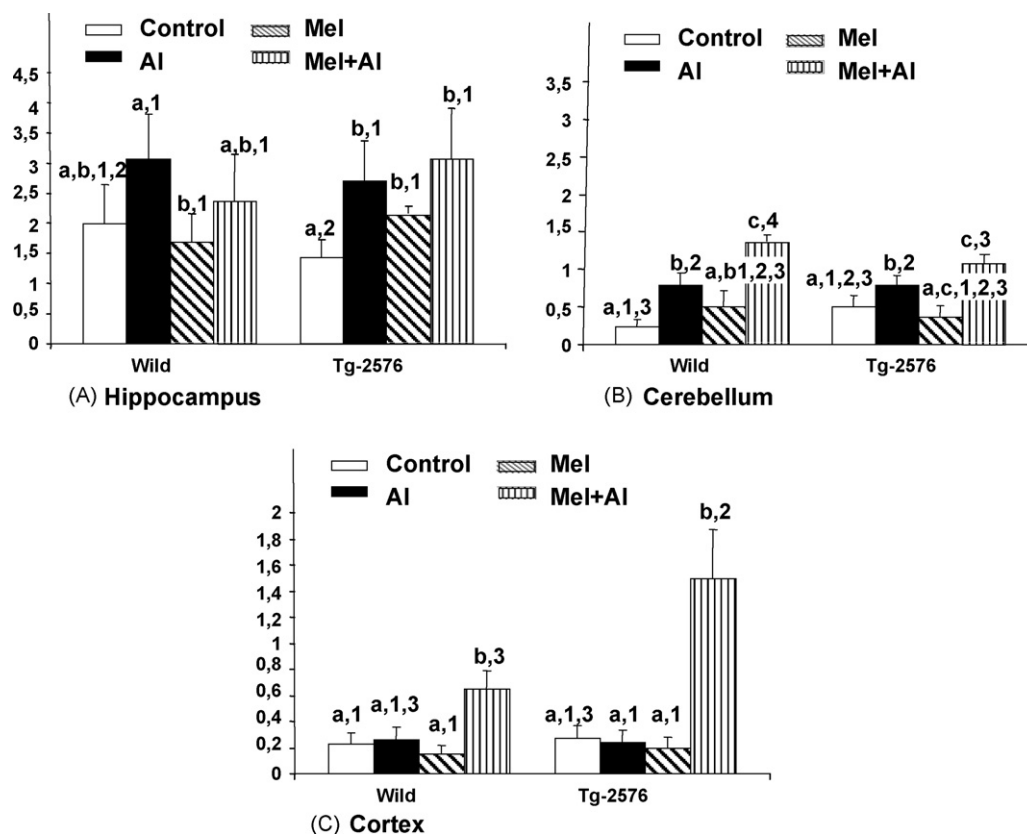


Fig. 5. Levels (mean values \pm SD) of aluminum in (A) hippocampus, (B) cerebellum, and (C) cortex of C57BL6/SJL (W) and Tg 2576 (Tg) mice exposed to 1 mg Al/g of food for 6 months. Different superscripts on the bars (1 and 2) indicate significant differences between groups. Different superscripts (a and b) indicate significant differences in the groups of a same strain. Level of significance: $p < 0.05$.

Recently, we investigated in Tg2576 mice the potential effects of a chronic or subchronic Al ingestion on some behavioral parameters including learning and memory (Ribes et al., 2006, 2008). In the current study, female Al-exposed transgenic and wild-type mice were evaluated to determine whether oral Al exposure might induce behavioral alterations, as well as the possible beneficial effects of melatonin treatment. General motor activity, habituation and anxiety levels were examined in an open-field. No significant effects of Al on general activity of transgenic or wild-type mice were found. This agrees with the results of previous studies showing no differences on general activity between treated and non-treated rats and mice (Colomina et al., 2002; Ribes et al., 2008; Roig et al., 2006). No melatonin effects on horizontal or vertical activity were observed. In relation to it, Brotto et al. (2001) did not find effects of chronic melatonin administration on rats in the open-field test. We observed a significant effect of the genotype of mice in the total number of rearings. Transgenic mice showed an enhanced rearing behavior, indicating an increased activity, which agrees with the results of other recent studies also performed in transgenic mice (Lalonde et al., 2003; Ribes et al., 2008).

Anxiety levels were determined in transgenic and wild-type animals measuring total distance traveled in the central area of the open-field. Melatonin-treated animals showed an increased total distance moved, which is compatible with decreased anxiety levels, potentially suggesting an anxiolytic effect of melatonin. Some authors have already demonstrated anxiolytic effects following melatonin administration (Pandi-Perumal et al., 2006).

No effects of Al and melatonin were found in the acquisition in the Morris water maze. However, a different effect of Al, depending on the genotype, was observed. Aluminum-treated Tg2576 animals showed an impaired acquisition on days 3 and 4. In a recent study (Ribes et al., 2008), we noted differences between genotypes, with

an impaired acquisition in Al-exposed wild mice, but not in exposed Tg2576. In that study, the dietary Al dose was 10 times lower than that administered in the present investigation, while mice were 9 months old, and a modified version of the Morris water maze task was used. It is important to note that in the current study, there were no differences between control Tg2576 and control wild mice. The absence of differences between non-exposed mice indicates that discrepancies may not be related only to the dose or period of treatment, but probably they are also related to sex, or to the specific Water Maze (WM) protocol. In this study, the WM protocol consisted in a 5 acquisition day protocol with 4 trials each day, while in Ribes et al. (2008), the WM acquisition protocol consisted in 3 trials each day for 5 days. Moreover, an internal mobile wall within the maze to prevent egocentrically learning was added. Thus, the protocol used in our previous research (Ribes et al., 2008) is more challenging, being probably more sensitive to that used in the current study. On the other hand, Al-exposed wild mice showed shorter latencies than non-exposed wild mice. This is significant only as a general trend, as during the acquisition period there were no differences between control wild and Al wild at any day. However, this trend is quite opposite to that found by Ribes et al. (2008). Not only the differences between dose and period of treatment, but also the protocol used in the WM, as well as sex differences should be taken into account. In the present investigation, a non-damaged neural system related to egocentrically learning could be the responsible for an apparent better execution of Al-exposed wild mice. Golub and Germann (2001), using a high Al dose (1000 μ g/g), reported an impaired acquisition in non-transgenic exposed female mice. However, in that study animals were treated from weaning to 35 days old, being tested at 3 months of age. Taken together, all these results indicate that Al impairs cognition when administered at high doses, being Tg2576 mice sensitive to these high Al doses.

It is interesting to note that in contrast to other studies where male mice were used (Ribes et al., 2008), in the current study female mice were the experimental animal model. Further investigations using the dose and time of exposure of the present study and a more challenging water maze task could be useful to better assess Al-induced behavioral deficits. They could provide a more complete and accurate information about Al implication on functional effects in subjects potentially vulnerable to AD.

There are several controversial results in the literature with respect to differences on learning and memory between wild and Tg2576 mice. Thus, Bizon et al. (2007) did not find learning impairments in adult Tg2576 mice, proposing A β levels produced by these animals were not sufficient to induce cognitive impairments associated to β -amyloid accumulation in medial temporal lobe, and suggesting water maze must not be the most optimal task for assessing medial temporal lobe in mice. In turn, Zhuo et al. (2007) did not find spatial reference memory affected in 6- and 14-month Tg2576 mice. However, other investigators reported spatial learning and memory alterations in Tg2576 mice, especially in old animals (Kobayashi and Chen, 2005). These apparently divergent results are probably related to the specificity of the behavioral task used and the cognitive domain explored (Ribes et al., 2008).

The hippocampus is involved in the acquisition of some spatial relations to form spatial memory. In this study, we generally found increased Al levels in the hippocampus of animals with respect to those detected in cortex and cerebellum. It agrees with the results from previous studies (Gómez et al., 2005; Struys-Ponsar et al., 1997). Likewise, when groups were compared, Al-treated Tg2576 animals showed significant higher Al levels in hippocampus than their respective transgenic control groups. As a whole, these results indicate that Al tends to accumulate in hippocampus. On the other hand, melatonin administration was not effective in preventing Al accumulation in hippocampus, while an increase of Al levels in cortex and cerebellum of mice concurrently exposed to Al plus melatonin could be observed. These results are in accordance with previous studies performed in our laboratory in Al-exposed rats where melatonin did not reduce Al accumulation in different brain areas (Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005). In summary, the results of the current investigation indicate that Tg2576 mice are sensitive to high dietary Al levels. This finding can be of interest and useful for those studies focused on investigating the role of Al in AD. A significant preventive/protector role of melatonin or chelating action could not be established.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgement

Financial support for this study was provided by the “Fondo de Investigación Sanitaria” (FIS), Ministry of Health, Spain, through grant No. PI050622.

References

Bizon, J., Prescott, S., Nicolle, M.M., 2007. Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging* 28, 440–446.

Brotto, L., Gorzalka, B.B., LaMarre, A.K., 2001. Melatonin protects against the effects of chronic stress on sexual behaviour in male rats. *Neuroreport* 12, 3465–3469.

Colomina, M.T., Roig, J.L., Sánchez, D.J., Domingo, J.L., 2002. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology* 23, 775–781.

Colomina, M.T., Roig, J.L., Torrente, M., Vicens, P., Domingo, J.L., 2005. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 565–574.

DeFries, J.C., Hegmann, J.P., Halcomb, R.A., 1974. Response to 20 generations of selection for open-field activity in mice. *Behav. Biol.* 11, 481–495.

Domingo, J.L., 2006. Aluminium and other metals in Alzheimer's disease: a review of potential therapy with chelating agents. *J. Alzheimers Dis.* 10, 331–341.

Domingo, J.L., Gomez, M., Sánchez, D.J., Llobet, J.M., Corbella, J., 1993. Effect of various dietary constituents on gastrointestinal absorption of aluminium from drinking water and diet. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 79, 377–380.

Drago, D., Bettella, M., Bolognin, S., Cendron, L., Scancar, J., Milacic, R., Ricchelli, F., Casini, A., Messori, L., Tognon, G., Zatta, P., 2008. Potential pathogenic role of b-amyloid1–42-aluminum complex in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 731–746.

Esparza, J.L., Gómez, M., Nogués, M.R., Paternain, J.L., Mallol, J., Domingo, J.L., 2005. Melatonin reduces oxidative stress and increases gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of aluminum-exposed rats. *J. Pineal Res.* 39, 129–136.

Exley, C., 2004. The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 380–387.

Exley, C., Esiri, M.M., 2006. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford Cornwall UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 877–879.

Ferreira, P.C., Piai, K., de Takayanagui, A.M., Segura-Muñoz, S.I., 2008. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev. Lat. Am. Enfermagem.* 16, 151–157.

Gaeta, A., Hider, R.C., 2005. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for promising therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol.* 146, 1041–1059.

García, T., Esparza, J.L., Nogués, M.R., Romeu, M., Domingo, J.L., in press. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. *Hippocampus* doi:10.1002/hipo.20612.

Golub, M.S., 2001. Behavioral studies in animals: past and potential contribution to the understanding of the relationship between aluminum and Alzheimer's disease. In: Exley, C. (Ed.), *Aluminum and Alzheimer's Disease*. Elsevier, Amsterdam, pp. 169–187.

Golub, M.S., Germann, S.L., 2001. Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behaviour of Swiss Webster mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 365–372.

Golub, M.S., Germann, S.L., Han, B., Keen, C.L., 2000. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150, 107–117.

Golub, M.S., Germann, S.L., Keen, C.L., 2003. Developmental aluminium toxicity in mice can be modulated by low concentrations of minerals (Fe Z P Ca Mg) in the diet. *Biol. Trace Elem. Res.* 93, 213–226.

Gómez, M., Esparza, J.L., Nogués, M.R., Giralt, M., Cabré, M., Domingo, J.L., 2005. Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 104–111.

Gómez, M., Esparza, J.L., Cabré, M., García, T., Domingo, J.L., 2008. Aluminum exposure through the diet: metal levels in AbPP transgenic mice a model for Alzheimer's disease. *Toxicology* 249, 214–219.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G., 1996. Correlative memory deficits Ab elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.

Hung, M.W., Tipoe, G.L., Poon, A.M., Reiter, R.J., Fung, L., 2008. Protective effect of melatonin against hippocampal injury of rats with intermittent hypoxia. *J. Pineal Res.* 44, 214–221.

Iregren, A., Sjögren, B., Gustafsson, K., Hagman, M., Nylén, L., Frech, W., Andersson, M., Ljunggren, K.G., Wennberg, A., 2001. Effects on the nervous system in different groups of workers exposed to aluminium. *Occup. Environ. Med.* 58, 453–460.

Kaneko, N., Takada, J., Yasui, H., Sakurai, H., 2006. Memory deficit in mice administered aluminum–maltolate complex. *Biometals* 19, 83–89.

Kilic, E., Kilic, U., Yulug, B., Hermann, D.M., Reiter, R.J., 2004. Melatonin reduces disseminate neuronal death after mild focal ischemia in mice via inhibition of caspas-3 and its suitable as an add-on treatment to tissue-plaminogen activator. *J. Pineal Res.* 36, 171–176.

Kilic, E., Kilic, U., Bacigaluppi, M., Guo, Z., Abdallah, N.B., Wolfer, D.P., Reiter, R.J., Hermann, D.M., Bassetti, C.L., 2008. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival neurogenesis and motor recovery and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. *J. Pineal Res.* 45, 142–148.

King, D.L., Arendash, G.W., 2002. Behavioural characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol. Behav.* 75, 627–642.

Klatzo, I., Wisniewski, H., Streicher, E., 1965. Experimental production of neurofibrillary degeneration. Light microscopic observation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 24, 187–199.

Kobayashi, D.T., Chen, K.S., 2005. Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 4, 173–196.

Korkmaz, A., Reiter, R.J., 2008. Epigenetic regulation: a new research area for melatonin? *J. Pineal Res.* 44, 41–44.

Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacaw, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V., 2007. Human health risk assessment for aluminum oxide and aluminium hydroxide. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 1, 1–269.

Kumar, V., Bal, A., Gill, K.D., 2009a. Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to a aluminum induced oxidative damage. *Toxicology* 255, 117–123.

Kumar, V., Bal, A., Gill, K.D., 2009b. Aluminum-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology* 264, 137–144.

Lack, B., Daya, S., Nyokong, T., 2001. Interaction of serotonin and melatonin with sodium potassium calcium lithium and aluminium. *J. Pineal Res.* 31, 102–108.

- Lahiri, D.K., Chen, D., Lahiri, P., Rogers, J.T., Greig, N.H., Bondy, S., 2004. Melatonin metals and gene expression: implications in aging and neurodegenerative disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1035, 216–230.
- Lalonde, R., Lewia, T.L., Strazielle, C., Kim, H., Fukuchi, K., 2003. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity anxiety and motor coordination. *Brain Res.* 977, 38–45.
- Limson, J., Nyokong, T., Daya, S., 1998. The interaction of melatonin and its precursors with aluminum cadmium copper iron lead and zinc: an adsorptive voltametric study. *J. Pineal Res.* 24, 15–21.
- Meyer-Baron, M., Schäper, M., Knapp, G., van Thriel, C., 2007. Occupational aluminium exposure: evidence in support of its neurobehavioral impact. *Neurotoxicology* 28, 1068–1078.
- Mizoroki, T., Meshitsuka, S., Maeda, S., Murayama, M., Sahara, N., Takashima, A., 2007. Aluminum induces tau aggregation in vitro but not in vivo. *J. Alzheimers Dis.* 11, 419–427.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., Arendash, G.W., 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985.
- Nogués, M.R., Giralt, M., Romeu, M., Mulero, M., Sánchez-Martos, V., Rodríguez, E., Acuña-Castroviejo, D., Mallol, J., 2006. Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J. Pineal Res.* 41, 142–149.
- Okatani, Y., Wakatsuki, A., Reiter, R.J., Miyahara, Y., 2002. Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol. Aging* 23, 639–644.
- Pandi-Perumal, S.R., Srinivasan, V., Maestroni, G.J., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin. Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273, 2813–2838.
- Praticò, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 16, 1138–1140.
- Quinn, J.F., Bussiere, J.R., Hammond, R.S., Montine, T.J., Henson, E., Jones, R.E., Stackman, R.W., 2007. Chronic dietary α -lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging* 28, 213–225.
- Ribes, D., Torrente, M., Vicens, P., Colomina, M.T., Domingo, J.L., 2006. Oral aluminum exposure: effects on locomotor activity and spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. In: Alpoim, M.C., Morais, P.V., Santos, M.A., Cristóvão, A.J., Centeno, J.A., Collery, P. (Eds.), *Metal ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 426–431.
- Ribes, D., Colomina, M.T., Vicens, P., Domingo, J.L., 2008. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 214, 293–300.
- Rodrigo, J., Fernández-Vizarra, P., Castro-Blanco, S., Bentura, M.L., Nieto, M., Gómez-Isla, T., Martínez-Murillo, R., Martínez, A., Serrano, J., Fernández, A.P., 2004. Nitric oxide in the cerebral cortex of amyloid precursor protein (SW) Tg2576 transgenic mice. *Neuroscience* 128, 73–89.
- Roig, J.L., Fuentes, S., Colomina, M.T., Vicens, P., Domingo, J.L., 2006. Aluminum restraint stress and aging: behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology* 218, 112–124.
- Sethi, P., Jyoti, A., Singh, R., Hussain, E., Sharma, D., 2008. Aluminium-induced electrophysiological biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology* 29, 1069–1079.
- Shi-Lei, S., Guang-Yu, M.A., Bachelor, L.H., Bachelor, Z.Y., Dong, H.M., Xu, X.H., 2005. Effect of naloxone on aluminum induced learning and memory impairment in rats. *Neurol. India* 53, 79–82.
- Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S.R., Cardinali, D.P., Poeggeler, B., Hardeland, R., 2006. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav. Brain Funct.* 4, 2–15.
- Stackman, R.W., Eckenstein, F., Frei, B., Kulhanek, D., Nowlin, J., Quinn, J.F., 2003. Prevention of age-related spatial deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by chronic Ginkgo biloba treatment. *Exp. Neurol.* 184, 510–520.
- Struys-Ponsar, C., Kerkhofs, A., Gauthier, A., Soffié, M., van der Bosch de Aguilar, P., 1997. Effects of aluminum exposure on behavioral parameters in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 56, 643–648.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., Reiter, R.J., 2007. One molecule many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res.* 42, 28–42.
- Walton, J.R., 2007. A longitudinal study of rats chronically exposed to aluminum at human dietary levels. *Neurosci. Lett.* 412, 29–33.
- Walton, J.R., 2009. Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminium equivalents. *Neurotoxicology* 30, 182–193.
- White, D.M., Longstreth, W.T., Rosenstock, L., Claypoole, K.H., Brodtkin, C.A., Townes, B.D., 1992. Neurologic syndrome in 25 workers from an aluminium smelting plant. *Arch. Intern. Med.* 152, 1443–1448.
- Yokel, R.L., Florence, R.L., 2006. Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227, 86–93.
- Yokel, R.A., Rhineheimer, S.S., Brauer, R.D., Sharma, P., Elmore, D., McNamara, P.J., 2001. Aluminum bioavailability from drinking water is very low and is not appreciably influenced by stomach contents or water hardness. *Toxicology* 161, 93–101.
- Zhuo, J.M., Prescott, S.L., Murray, M.E., Zhang, H.Y., Baxter, M.G., Nicolle, M.M., 2007. Early discrimination reversal learning impairment and preserved spatial learning in a longitudinal study of Tg2576 APPsw mice. *Neurobiol. Aging* 28, 1248–1257.

RESULTATS NO PUBLICATS

6. Efectes conductuals i cognitius de l'exposició a DFO

6.1. Test del camp obert (*Open field*)

Es va analitzar l'activitat general dels animals mitjançant un ANOVA de tres factors (genotip x alumini x DFO). Per realitzar aquesta anàlisi, es va avaluar la distància total recorreguda (activitat horitzontal) en el recinte i el nombre d'aixecaments verticals o *rearings* (activitat vertical) per part dels animals, així com el temps que els animals passaven en cada àrea del recinte (centre i perifèria).

Els resultats de l'anàlisi estadística, no van mostrar cap efecte significatiu del tractament amb DFO sobre l'activitat horitzontal.

Es va observar un efecte significatiu de la interacció genotip-DFO sobre el temps que els animals passaven en el centre del recinte [$F(1,62)= 6,421$, $p= 0,014$]. Mitjançant una anàlisi més detallada, varem observar diferències entre els grups de tractament (fig. 1).

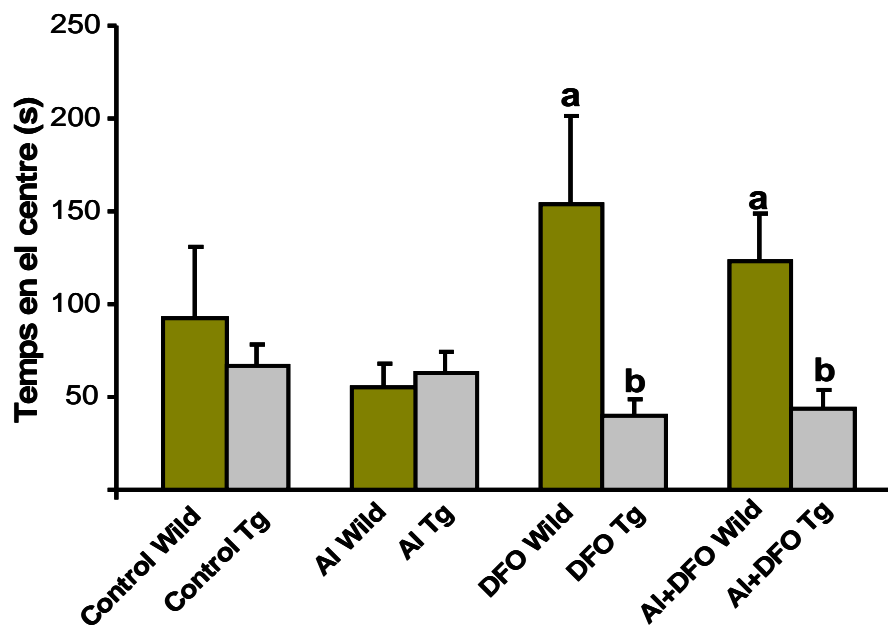


Figura 1. Temps total que els animals passen al centre del recinte. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM. Lletres diferents (a, b) indiquen diferències significatives entre els grups: $p < 0,05$.

Per valorar l'habitució dels animals al nou espai, es van analitzar els resultats dels primers 15 minuts en fraccions de 5 minuts cada una, considerant els períodes de temps de 0'-5', 5'-10' i de 10'-15'. Mitjançant un ANOVA de tres factors (genotip x alumini x DFO) per mesures repetides es va avaluar l'efecte general del genotip i dels tractaments amb alumini i DFO sobre la distància total recorreguda pels animals a través dels períodes assenyalats.

Un efecte significatiu de la variable temps [$F(2,62)= 19,056$, $p < 0,001$] ens permet veure com, en general, els grups disminueixen la seva activitat al llarg del temps, la qual cosa indica una habituació al nou espai (**fig. 2 i fig. 3**). De tota manera, cal remarcar que el grup d'animals transgènics tractats sols amb DFO no presenta aquesta habituació. Tanmateix, no es va observar cap efecte significatiu del tractament amb DFO sobre la distància total recorreguda.

Per últim, es va mesurar la ràtio de la distància recorreguda en el centre del recinte (distància recorreguda al centre/distància total). Els resultats van mostrar un efecte significatiu del DFO sobre la ràtio [$F(1,62)= 11,623$, $p= 0,001$], sent els animals dels grups tractats amb DFO els que donaven una major ràtio (**fig. 4**). Així mateix, també varem observar un efecte significatiu de la interacció genotip-DFO sobre la ràtio de la distància recorreguda en el centre del recinte [$F(1,62)= 17,779$, $p < 0,001$] (**fig. 5**).

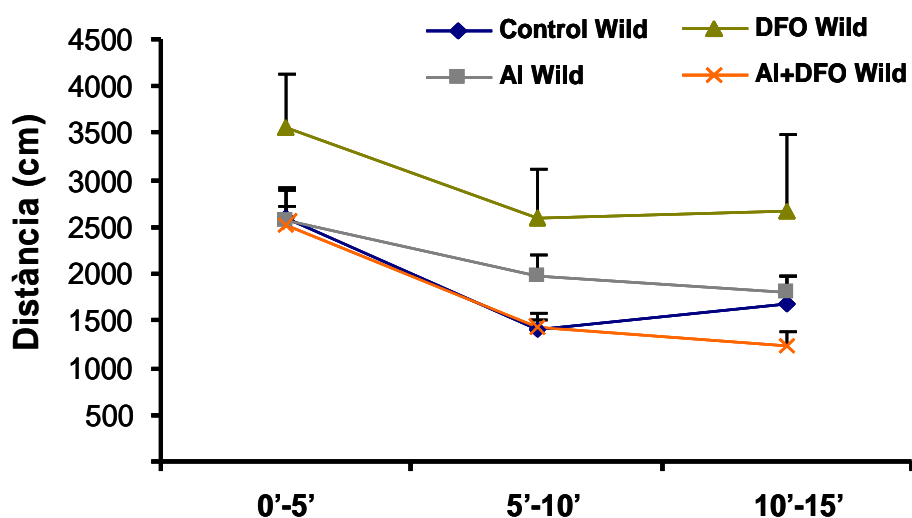


Figura 2.- Distància total recorreguda a través del temps.
Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

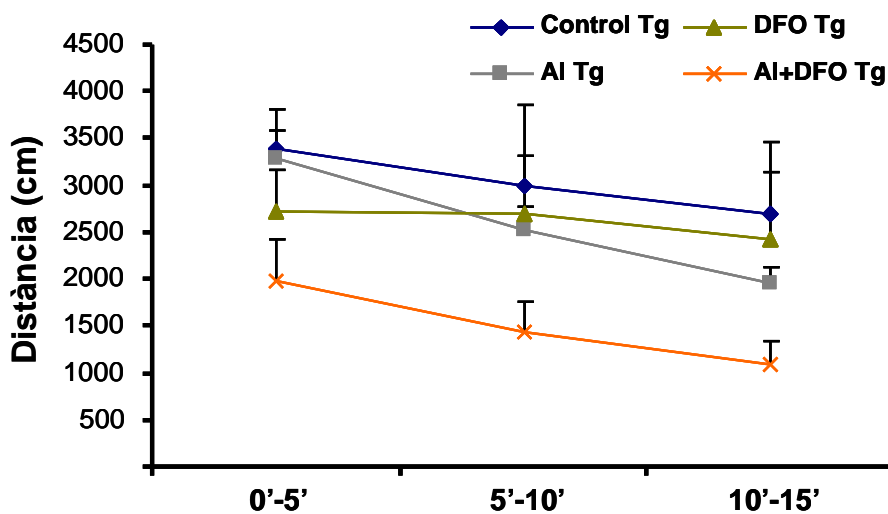


Figura 3.- Distància total recorreguda a través del temps. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

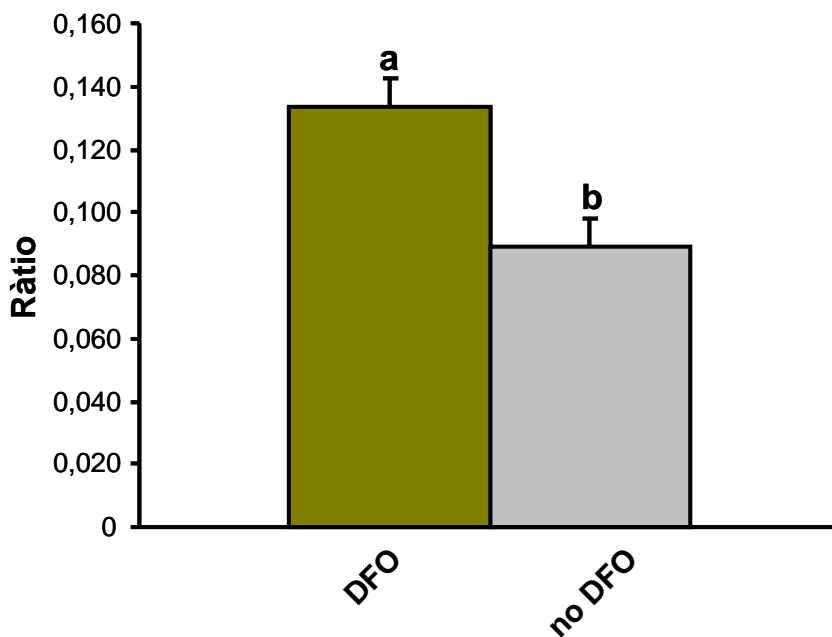


Figura 4.- Ràtio de la distància recorreguda en el centre del recinte. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM. Lletres diferents (a, b) indiquen diferències significatives entre els grups: $p < 0,05$.

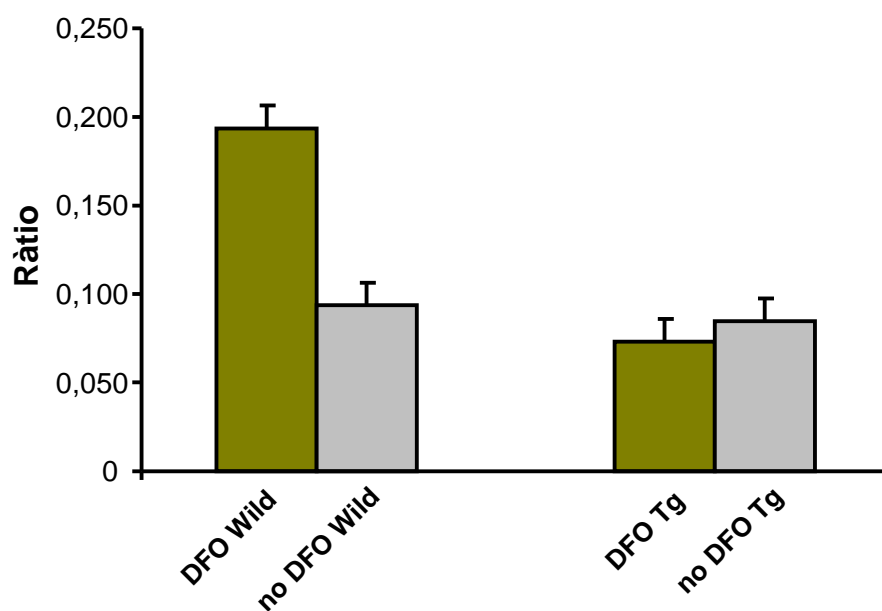


Figura 5.- Ràtio de la distància recorreguda en el centre del recinte. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

6.2. Test del laberint d'aigua de Morris (*Water Maze*)

Per avaluar l'aprenentatge espacial es van mesurar la latència i la distància total recorreguda fins a la plataforma durant els diferents dies que va durar la prova. Es va realitzar un ANOVA de tres factors (genotip x alumini x DFO) per mesures repetides.

Els resultats ens van mostrar un efecte significatiu del factor dia sobre la latència [$F(4,62)= 64,867$, $p<0,001$] i la distància total recorreguda [$F(4,62)= 32,905$, $p<0,001$], i van indicar una millora al llarg dels dies.

No es va observar cap efecte significatiu del tractament amb DFO sobre la latència, tot i que sí que vam poder observar un efecte significatiu del genotip [$F(1,62)= 5,433$, $p= 0,023$] (**fig. 6 i fig. 7**). Mitjançant una anàlisi més detallada, vam comparar els diferents grups entre si, i es van trobar diferències significatives entre els grups Al Wild i Al +DFO Wild i els grups Al Tg i Al+DFO Wild i Al Tg i Al+DFO Tg en el dia 4 [$X^2= 18,592$, $df 7$, $p<0,05$] (**fig. 8**). Tanmateix, també es van observar diferències significatives entre el grup Al Tg i Al+DFO Wild en el dia 5 [$X^2= 17,744$, $df 7$, $p<0,05$] (**fig. 9**).

D'altra banda, es va observar un efecte significatiu del DFO sobre la distància total recorreguda [$F(1,62) = 8,163$, $p = 0,006$] (**fig. 10 i fig. 11**). Tot i així, en comparar els diferents grups de tractament entre si, no es van observar diferències significatives.

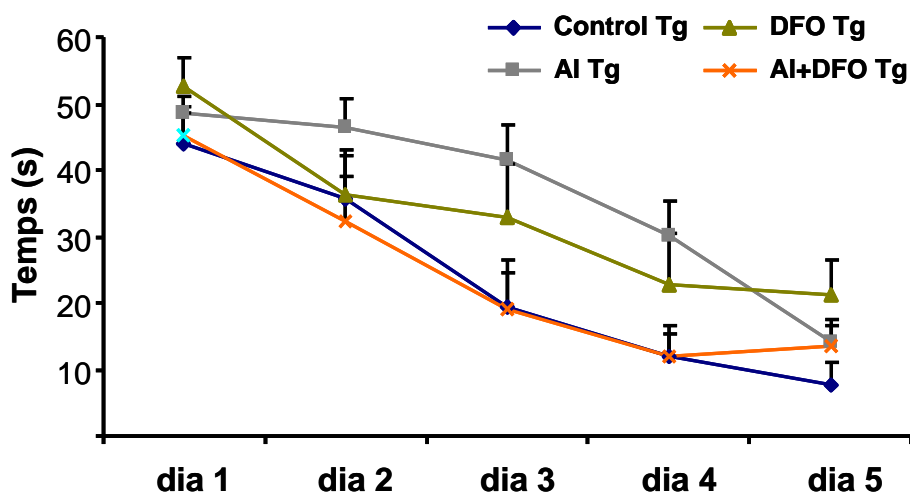


Figura 6. Temps total (segons) en trobar la plataforma.
Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM

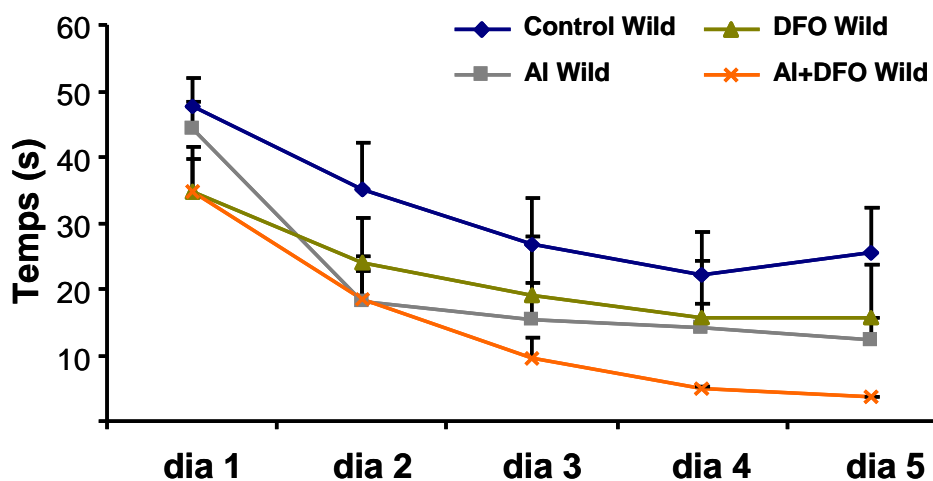


Figura 7. Temps total (segons) en trobar la plataforma.
Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

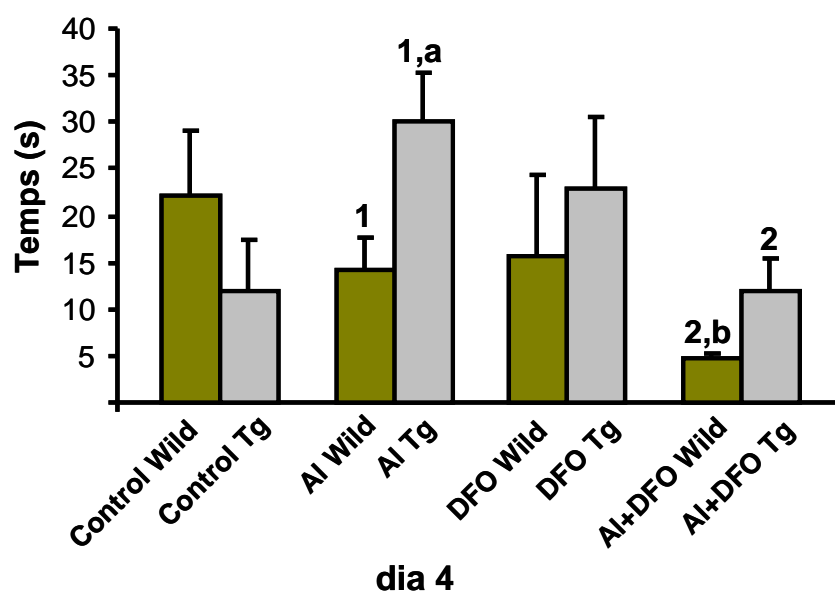


Figura 8.- Temps total (segons) en trobar la plataforma el dia 4. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM. Lletres diferents (a,b) indiquen diferències significatives entre els grups de diferent genotip. Nombres diferents (1,2) indiquen diferències significatives entre genotips similars: $p < 0,05$.

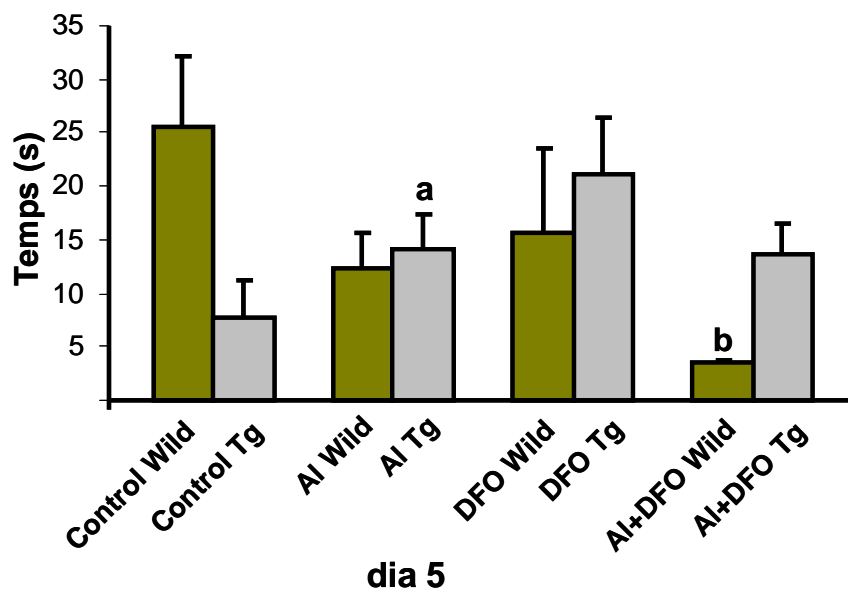


Figura 9.- Temps total (segons) en trobar la plataforma el dia 5. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM. Lletres diferents (a,b) indiquen diferències significatives entre els grups de diferent genotip. Nombres diferents (1,2) indiquen diferències significatives entre genotips similars: $p < 0,05$.

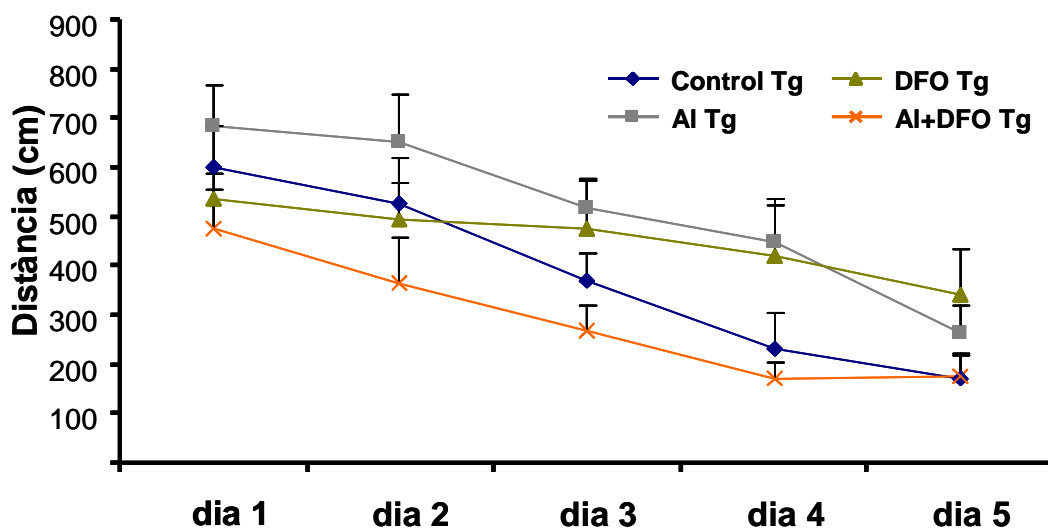


Figura 10. Distància total (cm) recorreguda en trobar la plataforma. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

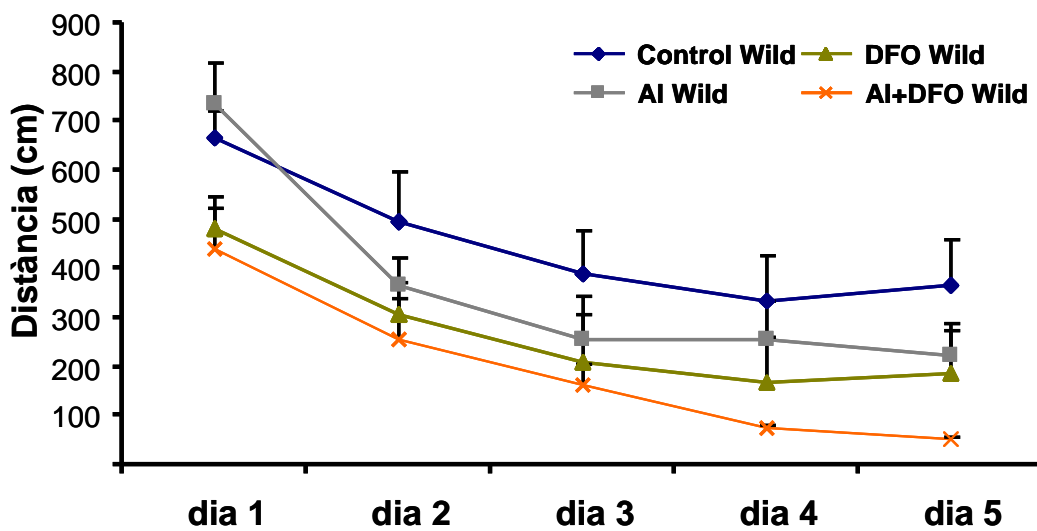


Figura 11. Distància total (cm) recorreguda en trobar la plataforma. Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

Per últim, la capacitat de retenció dels animals es va avaluar al cap de 4 hores d'haver finalitzat la prova d'adquisició. No es va observar cap efecte significatiu del DFO sobre la capacitat de retenció dels animals (fig. 12 i fig. 13).

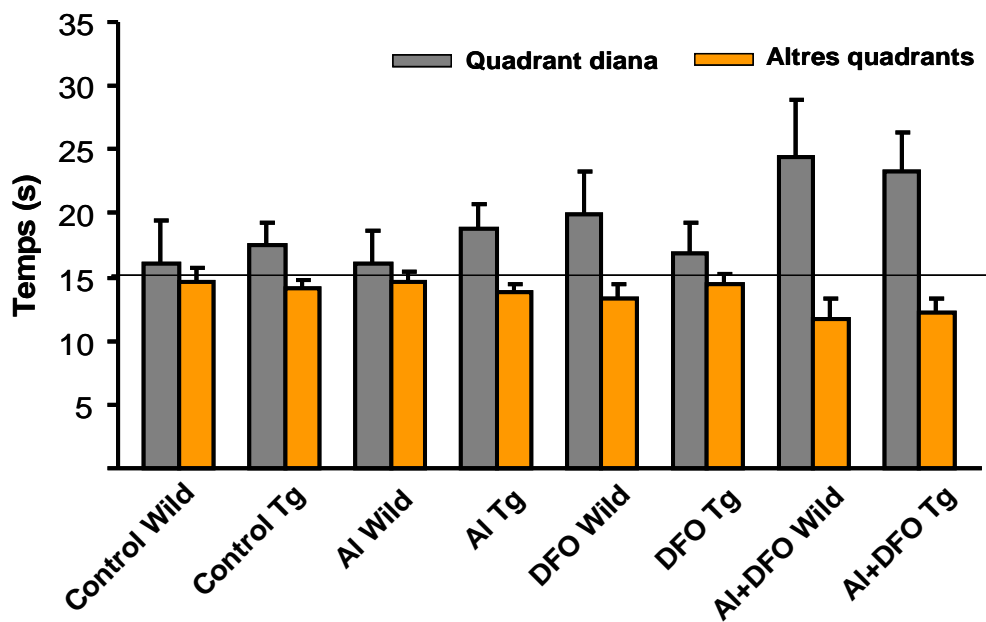


Figura 12. Temps (segons) passat en el quadrant diana.
Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

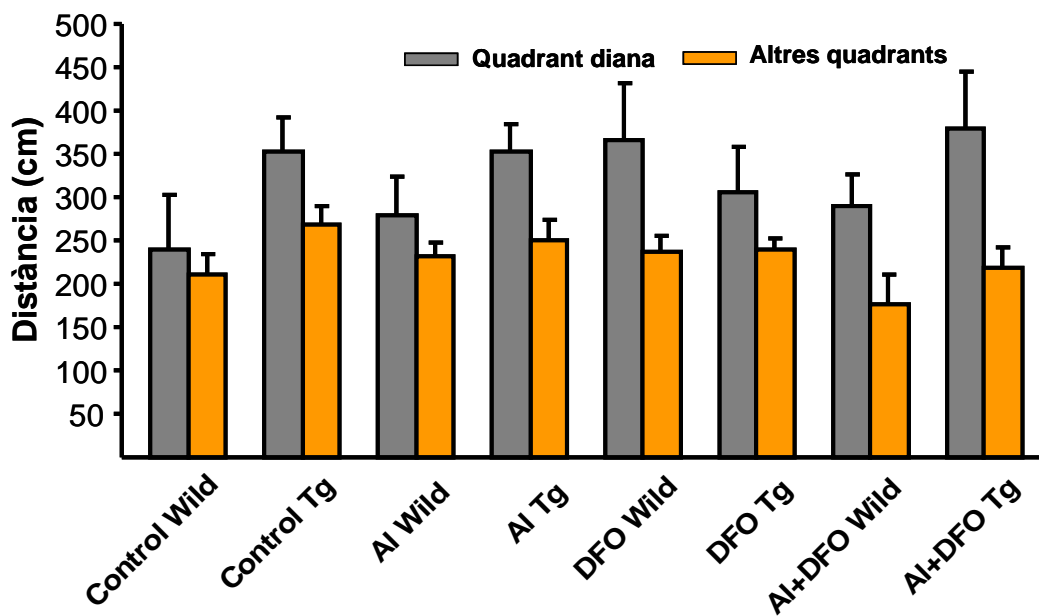


Figura 13. Distància (cm) recorreguda en el quadrant diana.
Les dades s'han expressat com a mitjanes \pm SEM.

DISCUSSIÓ

Seguint la línia de treball del Laboratori de Toxicologia i Salut Mediambiental de la Universitat Rovira i Virgili (Reus), per a la realització d'aquest treball d'investigació, ens varem centrar a estudiar el possible paper prooxidant de l'alumini en una soca de ratolins transgènics aptes per investigar la MA (Tg2576). Es varen avaluar els efectes d'aquest metall sobre les diverses defenses antioxidants enzimàtiques i no enzimàtiques, així com sobre l'expressió de l'mRNA dels enzims antioxidants responsables de la defensa front el dany oxidatiu. Tanmateix, varem considerar de gran importància l'observació dels efectes de l'alumini sobre certes capacitats cognitives que es troben malmeses en els pacients d'Alzheimer, i la determinació de l'acumulació cerebral d'altres metalls (coure, zinc, ferro i manganès) relacionats, com l'alumini, amb la patologia de la MA. En última instància, es va decidir avaluar els efectes de dos possibles agents protectors davant de la toxicitat de l'alumini: la melatonina (Mel) i la desferoxamina (DFO), dels quals es coneixen les propietats antioxidants i quelants respectivament.

CONCENTRACIONS DE METALLS DESPRÉS D'UNA EXPOSICIÓ CRÒNICA A UNA DOSI ALTA DE LACTAT D'ALUMINI

Certs metalls a concentracions adequades són essencials per a la vida i aporten efectes molt beneficiosos. Tot i així, a concentracions inadequades poden comportar-se com a tòxics i donar lloc a alteracions fisiològiques importants.

El cervell és un òrgan que normalment acumula coure, ferro i zinc. S'ha comprovat que existeix un increment depenent de l'edat en els nivells cerebrals d'alumini, coure, ferro i zinc, així com una relació entre una mala homeòstasi d'aquests metalls i certes malalties neurodegeneratives com la MA (Morita i col·l., 1994; Bartzokis i col·l., 1997; Liu i col·l., 2006; Yokel i col·l., 2006). De la mateixa forma, també s'han descrit els efectes tòxics que l'alumini pot exercir sobre diferents òrgans corporals com són els ronyons i els ossos.

Degut a aquests fets, varem considerar important la determinació dels nivells d'aquests metalls en diferents òrgans i teixits dels animals tractats amb alumini.

Existeix molt poca bibliografia sobre aquest tema. Practicó i col·l. (2002) van estudiar els efectes neurotòxics de l'alumini en ratolins Tg2576, però no van reportar els nivells d'alumini acumulats en les regions cerebrals examinades. En el nostre estudi es van determinar els nivells d'alumini, coure, zinc, ferro i manganès en diferents regions

cerebrals i teixits diana (hipocamp, còrtex, cerebel, ronyó, fetge i fèmur) davant d'una exposició oral a una dosi alta i crònica d'alumini (1 mg/g dieta). Per facilitar l'absorció del metall des del tracte gastrointestinal, l'alumini es va administrar en forma de lactat d'alumini.

No es va observar cap efecte de l'alumini en el pes del cervell dels animals al final del tractament. Tampoc es va veure cap efecte sobre el pes final dels ratolins, a diferència dels resultats trobats en estudis previs en què s'havien usat rates com animals d'experimentació, en les quals sí que es va detectar una disminució del pes com a conseqüència de l'exposició al metall (Esparza i col.l., 2003, 2005).

a) Efectes del genotip (Tg2576/*wild*) sobre la concentració de metalls

Per avaluar com el genotip influenciava sobre la concentració dels metalls en els diferents teixits diana estudiats, es van comparar els grups control per cada genotip (Tg2576/*wild*).

Els resultats van mostrar que als 11 mesos d'edat, un cop finalitzat el tractament, no existien diferències en la concentració de cap dels metalls estudiats degut al genotip dels animals.

Maynard i col.l. (2002) van estudiar en ratolins Tg2576 la concentració de diferents metalls, així com els efectes de l'edat i el sexe dels animals sobre aquests nivells. Els resultats van mostrar una disminució dels nivells de coure i zinc en els ratolins Tg2576 en comparació amb els seus respectius *wild*, en els quals aquesta reducció incrementava amb l'edat (11% als 2,8 mesos, 14% als 3,6 mesos, 14% als 11 mesos, i 16% als 18 mesos). Tanmateix, també varen observar un increment significatiu dels nivells de manganès en els animals transgènics. Tot i així, cal tenir en compte que algunes de les regions cerebrals estudiades en aquest treball van ser diferents de les avaluades en el nostre experiment.

b) Concentració d'alumini a l'hipocamp, còrtex i cerebel dels diferents grups de tractament

Els majors nivells d'alumini es van trobar en l'hipocamp dels animals. Tot i que no es va observar cap efecte del genotip sobre la concentració d'alumini, en comparar els grups tractats amb lactat d'alumini amb els seus respectius controls, vam observar que els ratolins Tg2576 exposats a alumini presentaven en l'hipocamp uns nivells d'aquest element superiors als seus controls Tg. És important remarcar aquest fet, ja que aquesta estructura cerebral es troba involucrada en la realització de certes capacitats cognitives que es troben alterades en els malalts d'Alzheimer i, a més, és un teixit que acumula depòsits del pèptid A β . Anteriorment, ja s'havia provat que l'alumini s'acumulava amb predominança en aquest teixit cerebral (Styrus-Ponsar i col·l., 1997; Esparza i col·l., 2003, 2005; Gómez i col·l., 2005). Tot i així, no varem trobar diferències significatives entre tractaments en el còrtex dels animals, teixit que també es troba relacionat amb el desenvolupament de la MA.

Aquests resultats indiquen que l'hipocamp és una estructura cerebral molt sensible a l'acumulació d'alumini.

c) Concentracions d'alumini en fetge, ronyons i fèmur dels diferents grups de tractament

No es va observar cap acumulació significativa d'alumini en el fetge i els ronyons dels animals tractats amb lactat d'alumini, així com tampoc en el fèmur. Tot i així, en general, els majors nivells d'alumini es van trobar als ronyons.

Els nivells d'alumini trobats tant en el cervell com en la resta de teixits analitzats són baixos en comparació amb els detectats en estudis previs del nostre laboratori (Esparza i col·l., 2003, 2005; Gómez i col·l., 2005). Aquest fet es deu segurament a la poca absorció que s'ha donat de l'alumini en el present cas, ja que l'exposició al metall s'ha realitzat a través de la dieta, a diferència d'estudis anteriors en què l'alumini s'administrava de forma intraperitoneal (Esparza i col·l., 2003, 2005; Gómez i col·l., 2005).

d) Concentracions de coure, zinc, ferro i manganès a l'hipocamp, còrtex i cerebel dels diferents grups de tractament

Tot i que no de forma significativa, els nivells de coure en hipocamp i cerebel dels controls Tg2576 són menors que els dels controls *wild*. Aquesta disminució dels nivells de coure en l'hipocamp de ratolins Tg2576 adults, ja l'havien mostrat abans Maynard i col.l. (2002). Així mateix, en mostres de l'hipocamp de pacients amb MA també s'havien trobat nivells menors de coure (Deibel i col.l., 1996).

El coure, al igual que el ferro i el zinc, és essencial per l'activitat neuronal: neurotransmissió, sinaptogènesi, neurogènesi i la síntesi de neurotransmissors. Tanmateix, el coure es troba unit a certs enzims com la SOD i la citocrom c oxidasa. Per tant, una disminució dels nivells de coure igual que una incorrecta acumulació del metall en aquells teixits vinculats amb la MA, podria donar lloc a alteracions fisiològiques (Deibel i col.l., 1996; Hung i col.l., 2010).

Altrament, quan els animals van estar exposats a lactat d'alumini, els resultats van mostrar un increment de la concentració de coure en l'hipocamp dels animals respecte als seus controls, de manera significativa en els ratolins transgènics. Cal tenir en consideració que l'alumini pot exercir els seus efectes prooxidants de forma sinèrgica amb el coure. Alguns estudis ja han mostrat que l'alumini pot potenciar el dany oxidatiu produït per certs metalls de transició com el coure (Becaria i col.l., 2003, 2006).

No es van trobar diferències en els nivells de ferro entre els grups de tractament en les diferents regions cerebrals estudiades, tot i que els majors nivells d'aquest metall es van trobar en el cerebel dels animals. Maynard i col.l. (2002) també van observar uns nivells similars de ferro als trobats en aquest estudi, tant per els ratolins transgènics Tg2576 com per els animals *wild*. En aquest mateix estudi es va observar un efecte significatiu del sexe dels animals respecte a la concentració dels metalls: els nivells de ferro només es trobaven alterats en els mascles.

Els majors nivells de manganès al cervell es van trobar en l'hipocamp dels animals. En comparar els animals exposats a alumini amb els seus respectius controls es va observar una major acumulació de manganès en els primers, tant en ratolins Tg2576 com en els animals *wild*. Aquest mateix resultat es va trobar en el còrtex dels mateixos animals i també es va observar per el zinc, tot i que en aquest cas els nivells del metall

també estaven incrementats en el cerebel dels animals Tg2576 exposats a alumini, respecte als seus controls.

Com en el cas del coure, aquests resultats s'han de remarcar, ja que aquests metalls formen part de diferents enzims i processos fisiològics, i una mala homeòstasi dels mateixos s'ha relacionat amb la MA. També Religa i col·l. (2006) van trobar majors concentracions de zinc en el còrtex de pacients amb Alzheimer i com aquest increment es trobava relacionat amb un increment dels nivells de A β . Tanmateix, hi ha estudis que mostren uns resultats contradictoris en trobar menors nivells de zinc i manganès en el cervell de ratolins Tg2576 (Maynard i col·l., 2002).

e) Concentracions de coure, zinc, ferro i manganès al fetge, ronyons i fèmur dels diferents grups de tractament

En general, els nivells de ferro, coure, zinc i manganès en el fetge, ronyons i fèmur es troben incrementats en els grups d'animals tractats amb lactat d'alumini per ambdós genotips, tot i que aquest increment sols és significatiu per a certs grups i teixits.

L'acumulació de coure va ser significativament major en el fetge dels ratolins *wild* exposats a alumini respecte als seus controls. Els nivells de ferro són significativament majors en els ronyons i el fèmur dels grups Al Wild i Al Tg respectivament, en comparació amb els controls. Tanmateix, els nivells de manganès són significativament majors en el fetge i els ronyons del grup Al Tg, mentre que la concentració de zinc és significativament més gran en els ronyons del grup Al Wild.

En estudis anteriors amb rates exposades a alumini a través de l'aigua de beguda no es van trobar diferències significatives en els nivells de coure, ferro, manganès i zinc entre animals tractats i els seus controls en cap dels teixits estudiats (Esparza i col·l., 2000). Per contra, en rates exposades a alumini per via intraperitoneal, els nivells de manganès al fetge van disminuir en els animals tractats (Esparza i col·l., 2003).

EFFECTES PROOXIDANTS DE L'ALUMINI EN L'HIPOCAMP, CÒRTEX I CEREBEL DE RATOLINS Tg2576 EXPOSATS A LACTAT D'ALUMINI

Per avaluar el paper prooxidant de l'alumini sobre el sistema antioxidant, cal considerar que hi ha un equilibri entre diversos enzims i molècules antioxidants. Així, no sols hem de considerar si l'activitat d'un enzim es troba elevada o disminuïda, sinó que hem de valorar els diversos enzims i les reaccions enzimàtiques en conjunt.

a) Efectes del genotip sobre els sistemes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics

En l'hipocamp, en comparar els grups control no es va observar cap efecte del genotip (Tg2576/*wild*) sobre cap dels marcadors oxidatius avaluats (CAT, SOD, GPx, GR, GSH, GSSG, TBARS).

En el còrtex el grup control Tg va mostrar un increment significatiu dels nivells de GSSG respecte dels controls *wild*, així com una disminució de l'activitat de GR.

Aquests resultats semblen mostra que en el còrtex dels animals, la soca Tg2576 a una edat d'11 mesos és més susceptible al dany oxidatiu.

b) Efectes d'una dosi alta i crònica d'alumini sobre els sistemes antioxidants enzimàtics i no enzimàtics

- **Hipocamp**

Després de 6 mesos de tractament oral a una dosi alta de lactat d'alumini, no es va poder observar que l'exposició al metall exercís cap efecte significatiu sobre cap dels marcadors oxidatius avaluats (GSSG, GSH, SOD, CAT, GR, GPx, TBARS) en l'hipocamp de cap dels grups d'animals estudiats (ni en els *wild*, ni en els Tg2576). Tot i així, sí que es va trobar un efecte general significatiu de l'exposició a l'alumini sobre l'activitat de la GR, SOD i GSH.

Tot i que aquest és el primer estudi que el nostre laboratori fa amb ratolins transgènics, estudis anteriors amb rates sí que van mostrar canvis en l'activitat de la SOD, i en els nivells de GSSG, TBARS i GSH, encara que en aquests experiments l'alumini era administrat per via intraperitoneal, i d'aquesta forma l'absorció del metall era major, i per tant, també els seus efectes neurotòxics (Esparza i col·l., 2003; Gómez i col·l., 2005).

- **Còrtex i cerebel**

El glutatió és un dels principals sistemes de defensa fisiològics davant del dany oxidatiu. L'acció antioxidant del glutatió es deu al grup tiol del seu residu de cisteïna. Per tant, només pot exercir el seu paper protector quan es presenta en la seva forma reduïda (GSH). Per això, és important que l'equilibri GSSG/GSH funcioni de forma correcta.

En el còrtex dels animals, l'exposició a alumini va donar lloc a un increment significatiu dels nivells de GSSG i de l'activitat de GR en els animals *wild*. En canvi, en els animals transgènics sols es va veure incrementada l'activitat de la GR.

En principi, un increment de l'activitat de GR ens podria fer pensar que facilitaria una acció antioxidant (GR és l'enzim més important en la reducció del glutatió), sempre que no es trobés una relació GSSG/GSH alta, ja que aleshores podria considerar-se com un estat oxidat. En el present estudi, l'exposició a alumini no va donar lloc a cap alteració dels nivells de GSH en el còrtex dels animals, tot i que, tal i com ja s'ha comentat, sí que es van trobar augmentats els nivells de GSSG en el grup Al Wild.

En el cerebel, l'exposició a alumini només va provocar una disminució significativa de l'activitat de GPx en els ratolins Tg2576, en mostrar el grup Al Tg uns valors menors d'activitat que el seu grup control.

No s'ha notat cap efecte de l'exposició a lactat d'alumini sobre la SOD ni la CAT, ni en còrtex ni en cerebel. L'actuació de la GPx depèn del teixit i de la concentració d'hidroperòxids. En cervell, la GPx actua predominantment sobre la CAT com a detoxificant del H₂O₂. Possiblement per això no hem trobat alterada l'activitat de la CAT (Halliwell i Gutteridge, 2007; Kodydková i col·l., 2009).

Estudis recents han evidenciat les propietats prooxidants de l'alumini. S'ha observat que l'administració d'alumini incrementa la peroxidació lipídica en diferents espècies animals: rates (Esparza i col·l., 2005; Gómez i col·l., 2005; Di Carlo, 2009), conills (Abd-Elghaffar i col·l., 2005), i fins i tot ratolins Tg2576 exposats a alumini (Practicó i col·l., 2002). Tot i que en el nostre estudi l'alumini no ha exercit un efecte significatiu sobre els nivells de TBARS en cap de les regions cerebrals, sí que es va observar un increment dels mateixos en tots els grups exposats a alumini. Això es deu segurament

al fet que l'acumulació d'alumini que es va produir no va ser prou alta per poder observar un efecte significatiu. En comparar els diferents teixits entre si, es va observar que el còrtex era la regió cerebral que presentava majors nivells de TBARS.

Aquests resultats indiquen que el còrtex és el més afectat per l'exposició a alumini, amb diversos enzims antioxidants alterats. Aquests resultats suggereixen que el còrtex, una de les regions cerebrals més afectada en diverses malalties neurodegeneratives, seria el més sensible davant els efectes prooxidants de l'alumini a aquesta dosi i ruta d'administració.

c) Efectes d'una dosi alta i crònica d'alumini sobre l'expressió de l'mRNA dels enzims CAT, SOD i GR

En l'hipocamp, l'exposició a lactat d'alumini va provocar una disminució dels nivells d'mRNA de la CAT, tant per al genotip *wild* com per als Tg2576, tot i que aquesta disminució sols va ser significativa en els animals transgènics.

En còrtex i cerebel, l'exposició a alumini també va alterar els nivells d'mRNA de la CAT en els animals transgènics. Es va observar un augment de l'expressió de l'enzim en el còrtex dels ratolins Tg2576 tractats amb lactat d'alumini (grup Al Tg) i una disminució en el cerebel d'aquests animals. Aquest mateix patró (tot i que no de forma significativa) es va repetir per als altres dos enzims: SOD i GR.

Els resultats obtinguts en les regions cerebrals estudiades no corroboren que l'augment o la disminució de l'expressió d'RNA dels enzims estiguin lligats a un increment o una disminució de l'activitat enzimàtica. Aquest fet es pot explicar com a causa de certs processos que es duen a terme un cop finalitzada la transcripció dels gens, o bé perquè el transport dels productes gènics estigui alterat. Això podria donar lloc a alteracions de l'activitat enzimàtica.

EFFECTES PROTECTORS DE LA MELATONINA I LA DFO EN L'HIPOCAMP, CÒRTEX I CEREBEL DE RATOLINS Tg2576 EXPOSATS A LACTAT D'ALUMINI

a) Efectes de la melatonina sobre els nivells d'alumini a l'hipocamp, còrtex i cerebel de ratolins Tg2576

La melatonina pot unir-se a certs metalls essencials i tòxics com l'alumini, el cadmi, el coure, el ferro i el zinc (Limson i col·l., 1998). Tanmateix, Lack i col·l., (2001), van demostrar que la melatonina podia interactuar amb diversos metalls, inclòs l'alumini, i van concloure que la melatonina podria actuar com a agent quelant amb diverses potencials aplicacions farmacèutiques. Degut a aquests antecedents, varem pensar que en aquest estudi podríem trobar menors nivells d'alumini en els grups tractats amb alumini i melatonina, en comparació amb els grups tractats solament amb alumini.

No es va trobar cap efecte de la melatonina sobre els nivells d'alumini en l'hipocamp dels animals després del tractament en cap dels dos genotips. En còrtex i cerebel, també a diferència de l'esperat, es va observar un increment significatiu de la concentració d'alumini en els grups tractats amb aquest metall més melatonina (excepte pel al grup Al+Mel Tg al cerebel). Estudis anteriors amb rates exposades a alumini ja havien mostrat que la melatonina no reduïa els nivells cerebrals d'alumini (Esparza i col·l., 2005).

Tot i que, tal i com hem comentat, hi ha estudis que mostren que l'alumini pot unir-se a la melatonina (Limson i col·l., 1998), no està descrit que aquest alumini quelat sigui llavors detoxificat de l'organisme. Segons els presents resultats, la melatonina no actuaria detoxificant l'alumini acumulat, ja que fins i tot trobem una major acumulació d'alumini en còrtex i cerebel. Per tant, no es pot concloure que la melatonina sigui una bona alternativa terapèutica per detoxificar l'alumini.

b) Efectes de la DFO sobre els nivells d'alumini a l'hipocamp, còrtex i cerebel

Els efectes beneficiosos de la capacitat quelant de la DFO davant la toxicitat de l'alumini han estat mostrats en nombrosos estudis (Ackrill i col·l., 1980; Swartz, 1985; Yokel, 1994; Yokel, 2002b; Domingo, 2006).

En el present estudi, no varem trobar cap efecte significatiu de l'administració de DFO sobre els nivells d'alumini trobats en les diferents regions cerebrals avaluades. Fiejika i

col.l. (2001) tampoc van observar una disminució dels nivells d'alumini en ratolins en administrar-los DFO usant una dosi de 3,5 mmol/kg. Aquest resultat es deuen probablement al model d'animal experimental usat, o bé a la dosi emprada.

c) Efectes protectors de la melatonina davant l'acció prooxidant de l'alumini

El GSH és un dels antioxidants fisiològics més importants, que actua com a agent reductor intracel·lular i és un regulador del potencial redox cel·lular (Valko i col·l., 2007). En el present estudi, es va mostrar que els nivells de GSH en l'hipocamp dels animals exposats de forma conjunta a melatonina i lactat d'alumini estaven augmentats de forma significativa, tant per al genotip Tg2576 com per als animals *wild*, sent un indicatiu del paper antioxidant d'aquesta hormona (Reiter i col·l., 2003; Tomás-Zapico i Coto-Montés, 2005).

El tractament amb melatonina també va afectar l'activitat d'algun dels enzims antioxidants avaluats en l'hipocamp. En tots dos genotips (Tg2576 i *wild*), l'activitat de la GR es va veure disminuïda respecte als animals que només van ser tractats amb lactat d'alumini. Així mateix, l'activitat de la GPx es va veure augmentada en el grup Al+Mel Wild respecte als animals exposats sols a alumini. Aquests resultats mostren la capacitat antioxidant de la melatonina, a augmentar l'activitat dels enzims antioxidants responsables de les defenses fisiològiques davant del dany oxidatiu.

En còrtex, el tractament amb melatonina sols va afectar els grups d'animals transgènics. L'administració conjunta d'alumini i melatonina va donar lloc a un augment de l'activitat dels enzims CAT i GR i dels nivells de GSSG respecte als ratolins Tg2576 tractats sols amb alumini.

En el cerebel dels animals, el tractament amb melatonina també va exercir el seu efecte antioxidant en donar lloc a un increment dels nivells de la GSH en ambdós genotips, així com un increment de l'activitat de la SOD en el grup Al+Mel wild. En estudis anteriors amb rates, també es van trobar uns resultats similars (Esparza i col·l., 2005).

D'altra banda, la melatonina va semblar actuar com a agent antioxidant, en incrementar els nivells d'mRNA dels enzims CAT, SOD i GR en els tres teixits cerebrals (hipocamp, còrtex i cerebel) respecte als obtinguts en aquells grups d'animals que només van estar exposats a lactat d'alumini. Aquest efecte es va

observar tant per al genotip Tg2576 com per al genotip *wild*. Tot i així, en general, aquests resultats no es corresponen amb un increment de l'activitat d'aquests enzims en els respectius teixits. De fet, l'activitat de la CAT no es va veure alterada en cerebel, ni tampoc en l'hipocamp.

d) Efectes protectors de la DFO davant l'acció prooxidant de l'alumini

Es va observar un increment significatiu dels nivells de TBARS en hipocamp dels animals exposats a alumini més DFO, en comparació amb els animals exposats sols a alumini. Altrament, l'administració de DFO no va provocar cap canvi significatiu dels nivells de GSH en aquest teixit.

Tampoc es va observar cap canvi dels nivells de GSH en còrtex. En cerebel, els animals transgènics exposats a alumini més DFO van mostrar una disminució significativa dels nivells de GSH en comparació amb els animals Tg2576 exposats sols a lactat d'alumini. Tanmateix, en el cerebel, tot i que no de forma significativa, els nivells de TBARS també es van trobar augmentats en els grups d'animals als quals se'ls va administrar DFO.

Diversos autors han mostrat que l'administració a DFO reduïa el dany neuronal mitjançant la reducció del dany oxidatiu (Youdim i col·l., 2004; Park i col·l., 2006). Els nostres resultats no corroboren aquests estudis, ja que observem un increment de la peroxidació lipídica en hipocamp, així com una disminució del GSH en el cerebel dels animals.

Els nivells de GSSG es van trobar augmentats de forma significativa a l'hipocamp dels animals transgènics exposats conjuntament a DFO més alumini, en comparació amb el grup d'animals exposats sols a alumini. Per contra, en el cerebel, aquests nivells es van trobar disminuïts.

L'administració de DFO no va donar lloc a cap canvi significatiu de l'activitat de la CAT ni de la GR respecte els animals tractats sols amb alumini en cap dels teixits avaluats, i per a cap dels dos genotips. En canvi, l'administració de DFO va provocar una disminució significativa de l'activitat de la GPx en el cerebel del grup Al+DFO Tg i un augment significatiu de l'activitat de la SOD en hipocamp dels animals *wild* tractats amb DFO més alumini, respecte els ratolins tractats sols amb lactat d'alumini.

Altrament, l'expressió de l'mRNA de la CAT es va veure incrementada en hipocamp, còrtex i cerebel dels animals tractats conjuntament amb DFO i alumini en tots dos genotips. Tanmateix, l'expressió de l'mRNA de la GR es va veure augmentada en el grup Al+DFO Tg en les tres regions, així com en hipocamp i còrtex del grup Al+DFO *wild*. Tanmateix, també es va observar un increment significatiu de l'expressió de l'mRNA dels tres enzims en les tres regions cerebrals avaluades del grup DFO Wild respecte els seus controls. Aquests resultats podrien indicar un possible paper antioxidant de la DFO. Tanmateix, els resultats de l'expressió del mRNA dels enzims avaluats veiem que no mostren una correlació directa amb els resultats de l'activitat enzimàtica.

La DFO està considerada com un excel·lent agent quelant del ferro. Per tant, en disminuir els nivells de ferro, hauria de disminuir la reacció de Fenton, actuant com a un agent antioxidant (Finefrock i col·l., 2003; Youdim i col·l., 2004). Segons els nostres resultats, també podria actuar com a agent antioxidant en incrementar l'expressió gènica de certs enzims antioxidants. Malgrat tot, cal tenir en compte que un increment de la proteïna enzimàtica no es consideraria una acció antioxidant si aquesta no es troba activa. Per tant, els nostres resultats mostren que la DFO no actuaria com a agent antioxidant, tot i l'increment dels nivells d'mRNA dels enzims antioxidants avaluats, ja que aquest increment no es troba correlacionat amb un increment de l'activitat enzimàtica.

EFFECTES CONDUCTUALS I COGNITIVUS DE L'EXPOSICIÓ A ALUMINI, MELATONINA I DFO

a) Efectes conductuals i cognitius de l'exposició crònica a una dosi elevada de lactat d'alumini

La prova de camp obert té com a objectiu valorar la conducta de l'exploració a un ambient nou. A més, també pot mesurar l'ansietat o la por als espais oberts. Es considera que una activitat baixa en el centre del recinte està relacionada amb un elevat nivell d'ansietat de l'animal (Bouwknicht i col·l., 2007). D'altra banda, les condicions ansiogèniques sembla que donen lloc a una disminució en el nombre d'aixecaments verticals (Orito i col·l., 2007).

En aquest sentit, els nostres resultats van indicar que els grups d'animals transgènics mostraven, en general, uns nivells d'activitat majors que els seus respectius *wild*, ja que van efectuar un major nombre d'aixecaments verticals. Aquest fet ja havia estat observat en estudis recents (Lalonde i col·l., 2003; Ribes i col·l., 2008).

No es va notar cap efecte de l'alumini sobre l'activitat general dels animals, ni en l'activitat vertical, ni en l'horitzontal. En el nostre laboratori, ja fa temps que s'estudien els efectes de l'exposició a l'alumini sobre el comportament (Colomina i col·l., 1999; Colomina i col·l., 2002; Roig i col·l., 2006), però fa poc que s'ha començat a investigar els efectes de l'alumini en ratolins Tg2576 (Ribes i col·l., 2008, 2010). En aquests estudis previs tampoc es va observar cap efecte de l'exposició a alumini sobre l'activitat dels animals.

L'hipocamp i el còrtex cerebral s'han relacionat amb els processos cognitius d'aprenentatge i memòria. L'aprenentatge i la memòria espacial es relacionen amb la capacitat d'adquirir i retenir informació de l'ambient, permetent així desenvolupar-se en l'espai (Vicens i col·l., 2003).

Per avaluar l'efecte que l'exposició a alumini produïa sobre aquestes capacitats cognitives, els diferents grups d'animals van passar la prova del laberint d'aigua de Morris (Morris, 1984; Colomina i col·l., 1999).

No es va observar cap efecte significatiu de l'exposició a alumini sobre la capacitat d'aprenentatge dels animals. Tot i així, els nostres resultats sí que van mostrar que els ratolins Tg2576 tractats amb lactat d'alumini tenien una taxa pitjor d'execució de la tasca els dies d'entrenament 3 i 4 que els seus respectius grups control. També Ribes i col·l. (2010) van observar una pitjor capacitat d'aprenentatge en els animals Tg2576 tractats amb lactat d'alumini en les mateixes condicions experimentals que en el present estudi. Recentment, ja havíem observat una interacció significativa entre l'alumini i el genotip (*wild*/Tg2576), tot i que en aquest altre estudi van ser els animals *wild* tractats amb lactat d'alumini els que mostraven una pitjor taxa d'execució respecte dels seus controls (Ribes i col·l., 2008).

Aquestes diferències es deuen segurament a les diferents condicions d'exposició a alumini. En l'estudi de Ribes i col·l. (2008), la dosi administrada d'alumini va ser 10 vegades inferior, mentre que el temps d'exposició va ser de 3 mesos. També es va

usar una versió diferent de la prova del laberint d'aigua de Morris. En l'actual estudi, el protocol per a la prova d'adquisició va consistir en 5 dies d'assaig amb 4 *trials* cadascun, mentre que en l'estudi de Ribes i col.l. (2008) es van fer 3 *trials* per dia durant 5 dies d'assaig, i es va utilitzar un mecanisme específic per evitar l'ús de claus internes per part dels ratolins. També cal tenir en compte que l'edat dels ratolins en l'estudi de Ribes i col.l. (2008) va ser de 9 mesos mentre que els animals emprats en el present estudi tenien una edat d'11 mesos.

Hi ha una extensa literatura científica que revisa els possibles efectes neurotòxics de l'alumini sobre les capacitats cognitives i, igual que en els nostres estudis, els resultats són contradictoris. Mentre que uns autors no troben una relació entre l'exposició a alumini i alteracions en la memòria o l'aprenentatge dels animals (Bizon i col.l., 2007; Zhuo i col.l., 2007), d'altres sí (Kobayashi i Chen, 2005). Les diferències podrien deure's als diferents protocols conductuals utilitzats, o a les funcions avaluades. També l'especiació de l'alumini, la via d'administració, la dosi, el temps de tractament o l'espècie animal són variables que poden explicar les discrepàncies entre estudis.

Bizon i col.l. (2007) van proposar que els nivells de A β produïts pels ratolins transgènics Tg2576 no eren suficients per induir alteracions cognitives associades a l'acumulació de A β , i van suggerir que la prova del laberint d'aigua de Morris no era una tasca òptima per avaluar el lòbul temporal. De tota manera, cal tenir en compte que els diferents protocols usats en diversos laboratoris podrien influir en la sensibilitat d'aquesta prova.

No es va observar cap efecte de l'alumini sobre la capacitat de retenció dels animals en cap dels dos genotips, a diferència de Ribes i col.l. (2010), que sí que van observar un clar efecte de l'alumini tant en els animals Tg2576 com en els ratolins *wild*.

En resum, els nostres resultats mostren que els ratolins Tg2576 són sensibles a l'exposició crònica a una dosi alta de lactat d'alumini.

b) Efectes conductuals i cognitius de l'exposició a melatonina

Des que es va descobrir el paper antioxidant de la melatonina, nombrosos estudis han intentat mostrar els efectes protectors d'aquesta hormona pineal sobre certes malalties neurodegeneratives. La disminució dels nivells de melatonina que es donen en sang i

en el líquid encefaloraquídi de pacients d'Alzheimer ha suggerit una possible implicació de l'hormona amb la malaltia. Tanmateix, els estudis sobre l'efecte que la melatonina exerciria sobre les capacitats cognitives de malalts d'Alzheimer, són pràcticament inexistents (Oclese i col.l., 2009). Tampoc hi ha estudis sobre possibles efectes protectors de l'hormona envers les capacitats cognitives i conductuals davant d'una exposició a alumini.

Els resultats del present estudi no van mostrar cap efecte significatiu de la melatonina sobre l'activitat general dels animals en cap dels dos genotips (Tg2576/*wild*) ni es va observar tampoc cap efecte de l'hormona en els grups tractats amb alumini. Tampoc es va trobar cap efecte de la melatonina sobre el patró d'habitació. Tots els grups d'animals tractats i no tractats amb melatonina van habitar-se al nou ambient. Oclese i col.l. (2009) tampoc van observar cap efecte de l'administració crònica de melatonina (100mg/L d'aigua) sobre l'activitat de ratolins doble transgènics (APP/PS1) en la tasca del camp obert.

Oclese i col.l. (2009) tampoc van notar cap efecte de la melatonina sobre l'ansietat dels animals ni sobre les capacitats sensomotors, i van suggerir que els efectes que van trobar de la melatonina sobre les capacitats cognitives no es podien atribuir als efectes no cognitius de l'hormona. En l'estudi actual, en observar els nivells d'ansietat dels animals mitjançant la mesura de la distància total recorreguda al centre de l'*open field*, es va trobar un menor índex d'ansietat en els grups d'animals tractats amb melatonina, ja que aquests van recórrer més distància en el centre del recinte, la qual cosa suggereix una acció ansiolítica per part de la melatonina. Altres autors han notat també els efectes ansiolítics de l'administració de melatonina (Panadi-Perumal i col.l., 2006).

En la prova d'adquisició del laberint d'aigua de Morris, no es va observar cap efecte significatiu de la melatonina davant l'exposició a alumini, en comparar els grups d'animals tractats amb alumini més melatonina, respecte els grups tractats sols amb lactat d'alumini. D'altra banda, tampoc varem observar cap efecte beneficiós de la melatonina en la prova de retenció.

Zhang i Yu (2002) van observar, a diferència del nostre estudi, un efecte beneficiós de l'administració de melatonina sobre les alteracions cognitives produïdes per l'exposició a alumini, tot i que en aquest estudi la dosi i la via d'administració (intraperitoneal) de

la melatonina van ser diferents. Tanmateix, també s'ha observat com la melatonina administrada per via intraperitoneal millorava els dèficits de memòria espacial causats per dany traumàtic a l'hipocamp de rates immadures (Ozdemir i col.l., 2005).

c) Efectes conductuals i cognitius de l'exposició a DFO

No hem observat tampoc cap efecte de la DFO sobre l'activitat general dels animals, horitzontal o vertical.

Hi ha molt poca literatura científica que reporti els efectes de la DFO sobre el comportament a partir de la qual puguem comparar amb els presents resultats. Tot i així, Connor i col.l. (1989) van estudiar l'efecte protector de la DFO sobre l'activitat motora en rates tractades durant 30 dies amb sulfat d'alumini ($Al_2(SO_4)_3$) i tampoc van observar cap resultat significatiu de la DFO en la prova del camp obert. Tanmateix, es va poder observar que els animals *wild* tractats amb DFO passaven més temps al centre del recinte que els seus respectius transgènics i que per tant, mostraven una ansietat menor.

Aquest fet és remarcable, ja que indica que la DFO exerceix millor els seus efectes sobre els ratolins de soca salvatge. Hem de considerar que, en els animals *wild*, els nivells de certs oligoelements com ara el ferro es trobarien, en un principi, equilibrats i en els seus nivells normals, mentre que en els animals transgènics, pel seu genotip i per les alteracions fisiològiques i metabòliques que això comporta en els animals, aquests nivells s'haurien de trobar alterats. Per tant, podríem pensar que aquests resultats es deuen al fet que en els animals *wild* la DFO pot interactuar amb el ferro i altres oligoelements, tal i com s'esperaria, mentre que en els animals transgènics aquesta interacció es veuria alterada possiblement per desequilibris previs.

Aquests mateixos resultats s'observaren en estudiar la capacitat d'habitució dels animals al nou ambient al llarg d'un període de temps. Els resultats mostren una diferència en el comportament dels animals *wild* tractats amb DFO respecte dels seus respectius transgènics. Mentre que els primers segueixen un gràfic d'habitució positiu igual que tota la resta de grups de tractament, als animals transgènics tractats amb DFO sembla que no els sigui tan fàcil habitar-se al nou ambient.

Es van determinar els nivells d'ansietat dels animals mitjançant la mesura de la ràtio de la distància total recorreguda al centre del recinte. En primer lloc, es va observar

que en general, els animals tractats amb DFO (grups DFO i Al+DFO) presentaven una major ràtio que els grups no tractats amb el quelant, fet que és compatible amb una disminució dels nivells d'ansietat, la qual cosa suggereix un comportament ansiolític per part de la desferoxamina. Tanmateix, la significació de la interacció genotip-DFO trobada sobre la ràtio va tornar a mostrar un major efecte del quelant sobre els animals *wild*. Els animals *wild* tractats amb DFO van mostrar uns menors nivells d'ansietat en comparació amb els animals no tractats, mentre que en els animals transgènics, els valors de la ràtio són pràcticament iguals entre animals tractats i no tractats amb DFO.

Tots aquests resultats indiquen la importància del genotip, i segurament dels nivells i equilibri dels oligoelements sobre la capacitat d'acció amb què pot interactuar la DFO.

En la prova d'adquisició del laberint d'aigua de Morris, no es va trobar cap efecte significatiu de la DFO sobre la capacitat d'adquisició. Tot i així, quan es van comparar els diferents grups de tractament entre si, es va observar una disminució significativa de la latència en el dia 4 del grup Al+DFO Tg en comparació amb el grup Al Tg. En general, els gràfics de latència ens mostren que els grups Al+DFO de tots dos genotips tarden menys temps a trobar la plataforma que els animals tractats només amb alumini, tot i que aquest efecte no és significatiu.

Cal tenir en compte, que la DFO és un quelant que no pot creuar fàcilment la BHE, tot i que és possible que sota certes condicions fisiològiques, com ara processos d'inflamació, traumatismes, etc., sí que penetri al cervell (Okouchi i col.l., 2010). Probablement les poques diferències significatives trobades són degudes a la dificultat del quelant per creuar la BHE. Si la DFO la pogués penetrar més fàcilment, possiblement hauriem vist com la DFO facilitava la capacitat d'adquisició. Una alternativa per facilitar l'accés de la DFO al sistema nerviós central seria via intranassal, a través dels nervis olfactori i trigeminal.

Long i col.l. (1996) van estudiar quin efecte tenia l'administració intraperitoneal de DFO sobre el dany oxidatiu produït per un traumatisme en rates i els seus efectes sobre el comportament dels animals. Els resultats van indicar que les rates tractades amb DFO mostraven una millora en la prova del laberint d'aigua de Morris. Així mateix, Hanson i col.l. (2007) van avaluar si es produïen millores de la capacitat cognitiva en un model animal per a la MA, els ratolins APP/PS1 per administració intranasal de DFO. Els resultats van mostrar que la DFO millorava els resultats de la prova del laberint d'aigua de Morris en els animals transgènics.

RESUM GENERAL

Tot i que els resultats del present estudi mostren que l'alumini en el cervell s'acumula majoritàriament a l'hipocamp, en general, els nivells d'alumini acumulats en les regions cerebrals són baixos si els comparem amb estudis previs del nostre laboratori. Tanmateix, això no és degut al model animal utilitzat (Tg2576), ja que no hem trobat cap efecte significatiu del genotip sobre la concentració dels metalls. Probablement, la via d'administració i l'especiació de l'alumini, no hagin facilitat l'absorció del metall. També hi poden haver influït la durada del tractament i l'edat dels animals.

Tot i que el genotip dels animals no ha afectat l'acumulació de metalls, sí que s'ha observat com en el còrtex cerebral, els animals transgènics són més susceptibles al dany oxidatiu, almenys als 11 mesos, que era l'edat dels animals un cop finalitzat el tractament.

L'alumini acumulat en hipocamp, còrtex i cerebel no ha estat suficient per induir grans efectes oxidants. Tot i així en conjunt, l'anàlisi dels sistemes antioxidants (enzimàtics i no enzimàtics) i els resultats de l'expressió de l'mRNA dels enzims CAT, SOD i GR mostren que l'alumini podria actuar com a un possible agent prooxidant. Si l'acumulació d'alumini hagués estat major, aquests efectes haurien estat possiblement més marcats. Tanmateix, els resultats actuals mostren que el còrtex és el teixit cerebral més sensible al dany oxidatiu davant l'exposició a una dosi alta i crònica de lactat d'alumini.

Els resultats de l'estudi amb melatonina i DFO com a possibles agents protectors envers el dany oxidatiu induït per l'alumini van mostrar com la melatonina, tal com ja s'havia vist amb anterioritat, actuava com a agent antioxidant en augmentar els nivells de GSH i incrementar l'activitat de la CAT i la GR en el còrtex, i de la SOD en el cerebel dels animals, i en a incrementar l'expressió de l'mRNA dels enzims CAT, SOD i GR. En contra però, la DFO no va mostrar una capacitat antioxidant clara, ja que va donar lloc a un increment dels nivells de TBARS i GSSG, tot i l'increment dels nivells d'mRNA dels enzims antioxidants, ja que aquesta expressió no va mostrar una correlació directa amb l'activitat enzimàtica.

Altrament, ni la melatonina ni la DFO van mostrar capacitat per detoxificar l'alumini del cervell dels animals. En el cas de la melatonina, ja s' havien observat resultats similars en estudis previs (Esparza i col.l., 2005).

Per altra banda, l'exposició a una dosi alta i crònica d'alumini (1 mg/g dieta), no va donar lloc a alteracions de l'activitat general dels animals, així com tampoc de les seves capacitats cognitives. Tan la melatonina com la DFO van mostrar un comportament ansiolític.

CONCLUSIONS

1. L'administració d'una dosi oral, crònica, d'1 mg d'alumini/g de pinso ha donat lloc a una major acumulació d'alumini en els ronyons dels animals. En el teixit cerebral, la major acumulació d'alumini es dona en hipocamp.
 2. En el teixit cerebral, l'exposició a lactat d'alumini ha comportat un increment de la concentració de coure, manganès i zinc en hipocamp i de manganès i zinc en el còrtex dels ratolins.
 3. En general, l'exposició a lactat d'alumini ha incrementat els nivells de coure, ferro, zinc i manganès en fetge, ronyons i fèmur.
 4. La melatonina no actua com a agent detoxificador de l'alumini en el teixit cerebral.
 5. La desferoxamina, no exerceix cap efecte significatiu sobre la concentració d'alumini en el teixit cerebral.
 6. Prenent en conjunt els resultats de l'anàlisi dels sistemes antioxidants i de l'expressió d'mRNA dels enzims antioxidants, s'observa com l'alumini podria actuar com a possible agent prooxidant en l'hipocamp, còrtex i cerebel dels animals.
 7. L'anàlisi dels sistemes antioxidants i de l'expressió d'mRNA dels enzims antioxidants suggereix que la melatonina actua com un bon agent antioxidant, tant a l'hipocamp com al còrtex i el cerebel dels animals.
 8. L'anàlisi dels sistemes antioxidants i de l'expressió d'mRNA dels enzims antioxidants indica que la desferoxamina no exerceix un paper antioxidant davant la toxicitat de l'alumini.
 9. L'exposició a lactat d'alumini no ha donat lloc a cap efecte sobre l'activitat general en la prova de camp obert, ni a cap alteració de les capacitats d'aprenentatge i retenció en la prova del laberint d'aigua de Morris.
-

- 10.** Els animals tractats amb melatonina han mostrat un menor índex d'ansietat en la prova de camp obert, la qual cosa suggereix una acció ansiolítica per part de l'hormona. També la desferoxamina ha mostrat un menor índex d'ansietat en la prova.

 - 11.** S'ha trobat una efecte significatiu de la interacció entre el genotip i la desferoxamina sobre les capacitats conductuals i cognitives dels animals.
-

BIBLIOGRAFIA

Abd-Elghaffar, S. K. H., El-Sokkary, G. H., and Sharkawy, A. A. (2005). Aluminum-induced neurotoxicity and oxidative damage in rabbits: protective effect of melatonin. *Neuro Endocrinol Lett.* 26, 609-616.

Ackley, D.C. and Yokel, R.A. (1997). Aluminum citrate is transported from brain into blood via the monocarboxylic acid transporter located at the blood-brain barrier. *Toxicology.* 120, 89-97.

Acrkill, P., Ralston, A. J., and Hodge, K. C. (1980). Successful removal of aluminum from patient with dialysis encephalopathy. *Lancet.* 2, 692-693.

Acuña-Castroviejo, D., Martin, M., Macias, M., Escames, G., Leon, J., Khaldy, H., and Reiter, R. J. (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 30, 65-74.

ACSA, Agència Catalana de Seguretat Alimentària. (2010). *Revaluació de substàncies.*

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2008). *Toxicological Profile for Aluminum.*

Allegra, M., Reiter, R.J., Tan, D.-X., Gentile, C., Tesoriere, L., Livrea, M.A. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 34, 1-10.

Alfrey, A. C., Legendre, G., and Kaehny, W. D. (1976). The dialysis encephalopathy syndrome. Possible Aluminum intoxication. *N Engl J Med.* 294, 184-188.

Alfrey, A. C., Mishell, J. M., Burks, J., Contiguglia, S. R., Rudolph, H., Lewin, E., and Holmes, J. H. (1972). Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 18, 257-261.

Altmann, P. (2001). In *Aluminum and Alzheimer's Disease. The science that describes the link* (C. Exley, Ed.), pp 1-36. Elsevier Science, Amsterdam.

Armstrong, R. A. (2009). Alzheimer's Disease and the eye. *J Optom.* 2, 103-111.

Aremu, D. A. and Meshituska, S. (2006). Some aspects of astroglial functions and aluminium implications for neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 52, 193-200.

Banasik, A., Lankoff, A., Piskulak, A., Adamowska, K., Lisowska, H., and Wojcik, A. (2005). Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral bloodlymphocytes treated during different phases of the cell cycle. *Environ Toxicol.* 20, 402-406.

Banks, A., Niehoff, M.L., Drago, D., Zatta, P. (2006). Aluminum complexing enhances amyloid β protein penetration of blood-brain barrier. *Brain Res.* 6, 215-221.

Barlow-Walden, L. R., Reiter, R. J., Abe, M., Pablos, M., Menendez-Pelaez, A., Chen, L. D., and Poeggeler, B. (1995). Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int.* 26, 447-452.

Bartzokis, G., Beckson, M., Hance, D. B., Marx, P., Foster, J. A., and Marder, S. R. (1997). MR evaluation of age-related increase of brain iron in young adult and older normal males. *J Magn Reson Imaging.* 15, 29-35.

Becaria, A., Bondy, S. C., and Campbell, A. (2003). Aluminum and copper interact in the promotion of oxidative but not inflammatory events: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 5, 31-38.

Becaria, A., Lahiri, D. K., Bondy, S. C., Chen, D., Hamadeh, A., Li, H., Taylor, R. T., and Campbell, A. (2006). Aluminum and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain. *J Neuroimag.* 176, 16-23.

Beuge, J. A. and Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.

Bharath, Shamasundar, N. M., Sathyanarayana Rao, T. S., Dhanunjaya Naidu, M., Ravid, R., and Rao, K. S. J. (2006). A new insight on Al-maltolate-treated aged rabbit as Alzheimer's animal model. *Brain Res Rev.* 52, 275-292.

Bizon, J., Prescott, S., and Nicolle, M. N. (2007). Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol Aging.* 28, 440-446.

Björ, O., Damber, L., Edström, C., and Nilsson, T. (2008). Long-term follow-up study of mortality and the incidence of cancer in a cohort of workers at a primary aluminum smelter in Sweden. *Scand J Work Environ Health*. 34, 463-470.

Bogdanović, M. and Bulat, P. (2008). Biliary function in workers occupationally exposed to aluminium dust and fumes. *Arh Hig Rada Toksikol*. 59, 135-139.

Bondy, S.C. (2010). The neurotoxicity of environmental aluminium is still an issue. *Neurotoxicology*, en premsa.

Bosetti, F., Solaini, G., Tendi, E. A., Chikhale, E. G., Chandrasekaran, K., and Rapoport, S. I. (2001). Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit III is selectively down-regulated by aluminium exposure in PC12S cells. *Neuroreport*. 12, 721-724.

Bouwknicht, J. A., Spiga, F., Staub, D. R., Hale, M. W., Shekhar, A., and Lowry, C. A. (2007). Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull*. 72, 32-43.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 148-254.

Buchta, M., Kiesswetter, E., Schaper, M., Zchiesche, W., Schaller, K. H., Kuhlmann, A., and Letzel, S. (2003). Neurotoxicity of exposures to aluminium welding fumes in the truck trailer construction industry. *Environ Toxicol Pharmacol*. 19, 677-685.

Burton, N.C., Guilarte, T.R. (2009). Manganese Neurotoxicity: Lessons Learned from Longitudinal Studies in Nonhuman Primates. *Environ Health Perspect*. 117, 325-332.

Bush, A. I., Pettingell, W. H., Multhaup, G., Paradis, M. D., Vonsattel, J., Gusella, J. F., Beyreuther, K., Masters, C. L., and Tanzi, R. E. (1994). Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science*. 265, 1464-1467.

Campbell, A. (2006). The role of aluminum and copper on neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 10, 165-172.

Campbell, A., Becaria, A., Lahiri, D. K., Sharman, K., and Bondy, S. C. (2004). Chronic exposure to aluminum in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain. *J Neurosci Res.* 75, 565-572.

Campbell, A., Prasad, K. N., and Bondy, S. C. (1999). Aluminium induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma. *Free Radic Biol Med.* 26, 1166-1171.

Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M. A., Bliss, T. V., Hyman, B. T., Younkin, S. G., and Hsiao, K. K. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci.* 2, 271-276.

Chong, Y. and Suh, Y. (1995). Aggregation of amyloid precursor proteins by aluminum in vitro. *Brain Res.* 670, 137-141.

Christen, Y. (2000). Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr.* 71, 621S-629S.

Cohen, G., Dembiec, D., and Marcus, J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem.* 34, 30-38.

Colomina, M. T., Roig, J. L., Domenec, J. S., and Domingo, J. L. (2002). Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology.* 23, 775-781.

Colomina, M. T., Sanchez, D. J., Sanchez-Turet, M., and Domingo, J. L. (1999). Behavioral effects of aluminum in mice: influence of restraint stress. *Neuropsychobiology.* 40, 142-149.

Connor, D. J., Harrell, L. E., and Jope, R. S. (1989). Reversal of an aluminum-induced behavioral deficit by administration of deferoxamine. *Behav Neurosci.* 103, 779-783.

Crapper, D. R., Krishnan, S. S., and Dalton, A. J. (1973). Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Trans Am Neurol Assoc.* 98, 17-20.

Daniels, W. M., Van Rensburg, S. J., Van Zyl, J. M., and Taljaard, J. J. (1998). Melatonin prevents beta-amyloid-induced lipid peroxidation. *J Pineal Res.* 24, 78-82.

De Marchi, U., Mancon, M., Battaglia, V., Ceccon, S., Cardellini, P., and Toniello, A. (2004). Influence of reactive oxygen species production by monoamine oxidase activity on aluminium-induced mitochondrial permeability transition. *Cell Mol Life Sci.* 61, 2664-2671.

Deibel, M. A., Ehmann, W. D., and Markesbery, W. R. (1996). Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. *J Neurol Sci.* 143, 137-142.

Deloncle, R., Huguet, F., Babin, P., Fernandez, B., Quellard, N., and Guillard, O. (1999). Chronic administration of aluminium L-glutamate in young mature rats: effects on iron levels and lipid peroxidation in selected brain areas. *Toxicol Lett.* 104, 65-73.

Deloncle, R., i Pages, N. (1997). Aluminum: on both sides of the blood-brain barrier. (M. Yasui, Strong, M.J., Ota, K., and M. A. and Verity, Eds.), 2nd ed., pp 91-97. CRC Press, Boca Raton, FL.

Di Carlo, M. (2009). Beta amyloid peptide: from different aggregation forms to the activation of different biochemical pathways. *Eur Biophys J.* 39, 877-888.

Divine, K. K., Lewis, J. L., Grant, P. G., and Bench, G. (1999). Quantitative particle-Induced X-ray emission imaging of rat olfactory epithelium applied to the permeability of rat epithelium to inhaled aluminum. *Chem Res Toxicol.* 12, 575-581.

Döllken, V. (1897). Ueber die Wirkung des Aluminiums mit besonderer Berücksichtigung der durch das Aluminium verursachten Läsionen im Centralnervensystem. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 40, 98-120.

Domingo, J. L. (2006). Aluminium and other metals in Alzheimer's disease: A review of potential therapy with chelating agents. *J Alzheimers Dis.* 10, 331-341.

Domingo, J. L., Llorens, J., Sanchez, D. J., Gomez, M., Llobet, J. M., and Corbella, J. (1996). Age-related effects of aluminum ingestion on brain aluminum accumulation and behavior in rats. *Life Sci.* 58, 1387-1395.

Donals, J. M., Golub, M. S., Gershwin, M. E., and Keen, C. L. (1989). Neurobehavioral effects in offspring of mice given excess aluminium in diet during gestation and lactation. *Neurotoxicol Teratol.* 11, 345-351.

Drago, D., Cavaliere, A., Mascetra, N., Ciavardelli, D., Di Ilio, C., Zatta, P., Sensi, S.L. (2008). Aluminum modulates effects of β amyloid1-42 on neuronal calcium homeostasis and mitochondria functioning and is altered in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Rejuvenation Res.* 11, 861-871.

EFSA, European Food Safety Authority. (2008). Safety of aluminium from dietary intake[1] - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC) (Question nº EFSA-Q-2008-254). *EFSA J.*

Eikelenboom, P., Veerhuis, R., Scheper, W., Rozemuller, Van Gool, W. A., and Hoozemans, J. M. (2006). The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 113, 1685-1695.

EPA, Environmental Protection Agency. (2005). *Toxic chemical release inventory reporting forms and instructions: Revised 2004 version. Section 313 of the Emergency Planning and Community Right-to-Know Act (Title III of the Superfund Amendments and Reauthorization Act of 1986)*. EPA260B05001. U.S. Environmental Protection Agency.

Esparza, J. L., Gomez, M., Domingo, J. L., Llobet, J.M., Corbella, J. (2000). Element variation following chelation therapy in young and old aluminum-loaded rats. *Metal Ions in Biology and Medicine* (J.A. Centeno, Ph. Collery, G. Vernet, R.B. Finkelman, H. Gibb and J.C. Etienne, Ed.) vol. 6, pp 594–596. John Libbey Eurotext, Paris.

Esparza, J. L., Gomez, M., Nogués, M., Paternain, J. L., Mallol, J., and Domingo, J. L. (2005). Effects of melatonin on oxidative stress and gene expression in cortex and cerebellum of aluminium-exposed rats. *J Pineal Res.* 39, 129-136.

Esparza, J. L., Gomez, M., Romeu, M., Mulero, M., Sánchez, D. J., Mallol, J., and Domingo, J. L. (2003). Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J Pineal Res.* 35, 32-39.

Exley, C. (2004). The pro-oxidant activity of aluminum. *Free Radic Biol Med.* 36, 380-387.

Exley, C. and Esiri, M. M. (2006). Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 77, 877-879.

Fiejka, M., Dlugaszek, M., Graczyk, A., Slowikowska, M., and Górska, P. (2001). Effects of aluminum and deferoxamine on concentration of essential elements in animals experimentally intoxicated with aluminum. *Med Dosw Mikrobiol.* 53, 101-106.

Finefrock, A. E., Bush, A. I., and Doraiswamy, P. M. (2003). Current status of metals as therapeutic targets in Alzheimer's Disease. *J Am Geriatr Soc.* 51, 1143-1148.

Flarend, R., Bin, T., Elmore, D., Hem, S.L. (2001). A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26. *Food Chem Toxicol.* 39, 163-168.

Flaten, T. P. (2001). Aluminum as a risk factor in Alzheimer's disease , with emphasis on drinking water. *Brain Res Bull.* 55, 187-196.

Forster, D. P., Newens, A. J., Kay, D. W., and Edwarson, J. A. (1995). Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England. *J Epidemiol Commun Health.* 43, 253-258.

Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., and Cole, G. M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol.* 152, 307-317.

Gaeta, A., and Hider, R. C. (2005). The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol.* 146, 1041-1059.

Gitto, E., Tan, D. X., Reiter, R. J., Karbownik, M., Manchester, L. C., Cuzzocrea, S., and Fulia, F. (2001). Individual and synergistic actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione, and desferoxamine in liver homogenates. *J Pharm Pharmacol.* 53, 1393-1401.

Golub, M. S., and German, S. L. (2001). Long-term consequences of developmental exposure to aluminium in a suboptimal diet for growth and behaviour of Swiss Webster mice. *Neurotoxicol Teratol.* 23, 365-372.

Golub, M. S., German, S. L., and Keen, C. L. (2003). Developmental aluminium toxicity in mice can be modulated by low concentrations of minerals (Fe, Z, P, Ca, Mg) in the diet. *Biol Trace Elem Res.* 93, 213-216.

Gomez, M., Esparza, J. L., Nogués, M., Giralt, M., Cabré, M., and Domingo, J. L. (2005). Pro-oxidant activity of aluminum in the rat hippocampus: gene expression of antioxidant enzymes after melatonin administration. *Free Radic Biol Med.* 38, 104-111.

Gonçalves, P. P. and Silva, V. S. (2007). Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity? *J Inorg Biochem.* 101, 1291-1338.

Greenwood, N. N. and Earnshaw, A. (1997). Chemistry of the Elements. (Greenwood, N. N. and Earnshaw, A., Ed.), 2nd ed., Elsevier Butterworth-Heinemann, U.K.

Greger, J.L. and Shutherland, J.E. (1997). Aluminum exposure and metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 34, 439-474.

Guelman, L. R. (2004). Deferoxamine antioxidant activity on cerebellar granule cells g-irradiated in vitro. *Neurotoxicol Teratol.* 26, 477-483.

Gutteridge, J. M. C., Quinlan, G. J., Clark, I., and Halliwell, B. (1985). Aluminum salts accelerate peroxidation of membrane-lipids stimulated by iron salts. *Biochim Biophys Acta.* 835, 441-447.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 97, 1634-1658.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (2007). *Free Radical in Biology and Medicine.* (Kelvin Davies., Ed.), 4th ed., Oxford University Press, UK.

Hanson, L. R., Fine, J. M., Tuttle, N. J., Marti, D. L., Matthews, R. B., Nguyen, T. M., Svitak, A. L., Panter, S. S., and Frey, W. H. (2007). Intranasally administered deferoxamine improves spatial memory in APP/PS1 mice. *Alzheimers Dement.* 3, S195.

Harrington, C. R., Wischik, C. M., McArthur, F. K., Taylor, G. A., Edwardson, J. A., and Candy, J. M. (1994). Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet.* 343, 993-997.

Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74, 214-226.

Höflich, B. L., Weinbruch, S., Theissmann, R., Gorzawski, K., Ebert, M., Ortner, H. M., Skogstad, A., Ellingsen, D. G., and Thomaassen, Y. (2005). Characterization of individual aerosol particles in workroom air of aluminum smelter potrooms. *J Environ Monit.* 7, 419-424.

Hsiao, K., Borchelt, D. R., Olson, K., Johhansdottir, R., Kitt, C., and Carlson, G. (1995). Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron.* 15, 1203-1218.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 274, 99-102.

Hung, Y. H., Bush, A. I., and Cherny, R. A. (2010). Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J Biol Inorg Chem.* 15, 61-76.

IARC, International Agency for Research on Cancer. (1984). Polynuclear aromatic compounds, Part 3, industrial exposures in aluminum production, coal gasification, coke production, and iron and steel founding. *Lyon, France: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.*

Jacqmin, H., Commenges, D., Letenneur, L., barberger-Gateau, P., and Dartigues, J. (1994). Components of drinking water and risk of cognitive impairment in the elderly. *Am J Epidemiol.* 139, 48-57.

Jacqmin, H., Commenges, D., Letenneur, L., and Dartigues, J. (1996). Silica and aluminum in drinking water and cognitive impairment in the elderly. *Epidemiology.* 7, 281-285.

Jia, Y., Zhong, C., Wang, Y., Zhao, R. (2001). Effects of aluminum intake on the content of aluminum, iron, zinc and lipid peroxidation in the hippocampus of rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 30, 132-134.

Jones, K. C. and Bennett, B. G. (1986). Exposure of Man to environmental aluminium-An exposure commitment assessment. *Sci Total Environ.* 52, 65-82.

Khanna, P., Nehru, B. (2007). Antioxidant enzymatic system in neuronal and glial cells enriched fractions of rat brain after aluminum exposure. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 959-969.

Kaneko, N., Sugioka, T., and Sakurai, H. (2007). Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: Insight into cellular damage caused by oxidative stress. *J Inorg Biochem.* 101, 967-975.

Kassem, M., Eriksen, E.F., Melsen, F., Mosekilde, L. (1991). Antacid-induced osteomalacia: a case report with a histomorphometric analysis. *J Intern Med.* 229, 275-279.

Kawahara, M. (2005). Effects of Aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 8, 171-182.

Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H., and Younkin, S. G. (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21, 372-381.

Klatzo, L., Wisniesky, H., and Streicher, E. (1965). Experimental production of neurofibrillary degeneration. Light microscopic observation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 187-199.

Klein, G. L. (2005). Aluminum: new recognition of an old problem. *Curr Opin Pharmacol.* 5, 637-640.

Kobayashi, D. T., and Chen, K. S. (2005). Behavioral phenotypes of amyloid-based genetically modified mouse models of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 4, 173-196.

Kodydková, J., Vávrová, L., Zeman, M., Jirák, R., Macásek, J., Stanková, B., Tvrzická, E., and Zák, A. (2009). Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem.* 42, 12-13.

Kong, S., Liochev, S., and Fridovich, I. (1992). Aluminum (III) facilitates the oxidation of NADH by the superoxide anion. *Free Radic Biol Med.* 13, 79-81.

Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A. M., and Rondeau, V. (2007). Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. In *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* (Armstrong, V. and Turner, M.C., Ed.), LLC ed., pp 1-269, Taylor & Francis Group, London, UK.

Kumar, A., Dogra, S., Prakash, A. (2009). Protective effect of curcumin (*Curcuma longa*), against aluminium toxicity: Possible behavioral and biochemical alterations in rats. *Behav Brain Res.* 205, 384-390.

Kumar, V., Bal, A., Gill, K.D. (2009). Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology.* 264, 137-144.

Kumar, V., and Kiran, D. G. (2009). Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Arch Toxicol.* 83, 965-978.

Lack, B., Daya, S., and Nyokong, T. (2001). Interaction of serotonin and melatonin with sodium, potassium, calcium, lithium and aluminium, *J Pineal Res.* 31, 102-108.

Lalonde, R., Lewia, T. L., Straziell, C., Kim, H., and Fukuchi, K. (2003). Transgenic mice expressing the BAPP₆₉₅SWE mutation: effects on exploratory activity anxiety and motor coordination. *Brain Res.* 977, 38-45.

Limson, J., Nyokong, T., and Daya, S. (1998). The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc: an adsorptive voltammetric study. *J Pineal Res.* 24, 15-21.

Liu, G., Huang, W., Moir, R. D., Vanderburg, C. R., Lai, B., Peng, Z., Tani, R. E., Rogers, J. T., and Huang, X. (2006). Metal exposure an Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol.* 155, 45-51.

Long, D. A., Ghosh, K., Moore, A. N., Dixon, C. E., and Dash, P. K. (1996). Deferoxamine improves spatial memory performance following experimental brain injury in rats. *Brain Res.* 717, 109-117.

Lukiw, W. J., Percy, M. E., and Kruck, T. P. (2005). Nanomolar aluminum induces pro-inflammatory and pro-apoptotic gene expression in human brain cells in primary culture. *J Inorg Biochem.* 99, 1895-1898.

Maccioni, R. B., Muñoz, J. P., and Barbeito, L. (2001). The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res.* 32, 367-381.

Madhusudan, G. S., White, S.M.; Flamm, W.G., and Burdock, G.A. (2001). Safety evaluation of dietary aluminum. *Regul Toxicol Pharmacol.* 33, 66-79.

Mahieu, S., Contini, M. C., González, M., and Millen, N. (2009). Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney. *Toxicol Lett.* 190, 9-15.

Markesbery, W. R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 23, 134-147.

Martyn, C. N., Coggon, D. N., Inskip, H., Lacey, R. F., and Young, W. F. (1997). Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Epidemiology.* 8, 281-286.

Maynard, C. J., Cappi, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., White, A. R., Beyreuther, K., Master, C. L., and Bush, A. I. (2002). Overexpression of Alzheimer's disease amyloid- β opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem.* 277, 44670-44676.

Maynard, C. J., Cappi, R., Volitakis, I., Cherny, R. A., Masters, C.L., Li, Q.X., Bush, A. I. (2006). Gender and genetic background effects on brain metal levels in APP transgenic and normal mice: implications for Alzheimer beta-amyloid pathology. *J Inorg Biochem.* 100, 952-962.

Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martin, V., and Rodriguez, C. (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 59, 1706-1713.

McLachlan, D. R., Smith, W. L., and Kruck, T. P. (1993). Desferrioxamine and Alzheimer's disease: video home behaviour assessment of clinical course and measures of brain aluminum. *Ther Drug Monit.* 15, 602-607.

McLaughlin, A. I., Kazantzis, G., King, E., Teared, Porter, R. J., and Owen, R. (1962). Pulmonary fibrosis and encephalopathy associated with the inhalation of aluminium dust. *Brit J Ind Med.* 19, 253.

Meglio, L., and Oteiza, P. I. (1999). Aluminum enhances melanin-induced lipid peroxidation. *Neurochem Res.* 24, 1001-1008.

Mendez-Alvarez, E., Soto-Otero, R., Hermida-Ameijeiras, A., Lopez-Real, A. M., and Labandeira-Garcia, J. L. (2002). Effects of aluminum and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydoamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 1586, 155-168.

- Mičić, D.V., Petronijević, N.D., Vučetić, S.S. (2003). Superoxide dismutase activity in the mongolian gerbil brain after acute poisoning with. *J Alzheimers Dis.* 5, 49-56.
- Misra, H. P., and Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 247, 3170-3175.
- Molina-Holgado, F., Hider, R. C., Gaeta, A., Williams, R., and Francis, P. (2007). Metal ions and neurodegeneration. *Biometals.* 20, 639-654.
- Molloy, D. W., Standish, T. I., Nieboer, E., Turnbull, J. D., Smith, S. D., and Dubois, S. (2007). Effects of acute exposure to aluminum on cognition in humans. *J Toxicol Environ Health A.* 70, 2011-2019.
- Morita, A., Kimura, M., and Itokawa, Y. (1994). The effect of aging on the mineral status of female mice. *Biol Trace Elem Res.* 42, 165-177.
- Morris, R. (1984). Developmental of water maze-procedure for studing spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth.* 11, 47-56.
- Morris, R. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv.* 12, 239-260.
- Moumen, R., Ait-Oukhatar, N., Bureau, F., Fleury, C., Bouglé, D., Arhan, P., Neuville, D., Viader, F. (2001). Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. *J Trace Elem Med Biol.* 15, 89-93.
- Multhaup, G., Ruppert, T., Schlicksupp, A., Hesse, L., and Beyreuther, K. (1997). Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 54, 533-539.
- Nehru, B., and Anand, P. (2005). Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains. *J Trace Elem Med Biol.* 19, 203-208.
- Newman, M., Musgrave, F. I., and Lardelli, M. (2007). Alzheimer disease: Amyloidogenesis, the presinilins and animals models. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 285-297.
-

Nogués, M. R., Giralt, M., Romeu, M., Mulero, M., Sánchez-Martos, V., Rodriaguez, E., Acuña-Castroviejo, D., and Mallol, J. (2006). Melatonin reduces oxidative stress in erythrocytes and plasma of senescence-accelerated mice. *J Pineal Res.* 41, 142-149.

Ohman, L. O., and Martin, R. B. (1994). Citrate as the main small molecule binding Al^{3+} in serum. *Clin Chem.* 40, 598-601.

Okauchi, M., Hua, Y., Keep, R.F., Morgenstern, L.B., Schallert, T., Xi, G. (2010). Deferoxamine treatment for intracerebral hemorrhage in aged rats: therapeutic time window and optimal duration. *Stroke.* 41, 375-382.

Olcese, J. M., Cao, C., Mori, T., Mamcarz, M. B., Maxwell, A., Runfeldt, M. J., Wang, L., Zhang, C., Lin, X., Zhang, G., and Arendash, G. W. (2009). Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res.* 47, 82-96.

OMS, Organització Mundial de la Salut. (1998). Aluminium in Drinking-water. Volumen 2, 2nd ed., Geneva.

Orito, K., Gotanda, N., Murakami, M., Ikeda, T., Egashira, N., Mishima, K., and Fujiwara, M. (2007). Prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) promotes angiogenic behavior in rats. *Tohoku J Exp Med.* 212, 151-157.

Oteiza, P. I. (1994). A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 308, 374-379.

Oteiza, P. I., Mackenzie, G., and Verstraeten, S. V. (2004). Metals in neurodegeneration: involvement of oxidants and oxidant-sensitive transcriptions factors. *Mol Aspects Med.* 25, 103-115.

Ozdemir, D., Tugyan, K., Uysal, N., Sonmez, U., Sonmez, A., Acikgoz, O., Ozdemir, N., Duman, M., and Ozkan, H. (2005). Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats. *Neurosci Lett.* 385, 234-239.

Panadi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., and Hardeland, R. (2006). Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 273, 2813-2838.

Papazisis, G., Pourzitaki, C., Sardeli, C., Lallas, A., Amaniti, E., and Kouvelas, D. (2008). Deferoxamine decreases the excitatory amino acid levels and improves the histological outcome in the hippocampus of neonatal rats after hypoxia-ischemia. *Pharmacol Res.* 57, 73-78.

Park, M. J., Lee, S. K., Lim, M. A., Chung, H. S., Cho, S. I., Jang, C. G., and Lee, S. M. (2006). Effect of alpha-tocopherol and deferoxamine on methamphetamine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* 1109, 176-182.

Prakash, A., Kumar, A. (2009). Effect of N-acetyl cysteine against aluminium-induced cognitive dysfunction and oxidative damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 105, 98-104.

Pennington, J. A. T., and Schoen, S. A. (1995). Estimates of dietary exposure to aluminum. *Food Addit Contam.* 12, 119-128.

Perl, D. P. (2001). The association of aluminum and neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease, a personal perspective. In *Aluminum and Alzheimer's disease* (C. Exley, Ed.), pp 133-146. Elsevier, UK.

Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Mt Sinai J Med.* 77, 69-81.

Perl, D.P. and Brody, A.R. (1980). Alzheimer's Disease: X-ray spectrographic evidence of aluminium accumulation in neurofibrillary tangle-bearing neurons. *Science.* 208, 297-299.

Perl, D. P. and Good, P. F. (1987). Uptake of aluminium into central nervous system along nasal-olfactory pathways. *Lancet.* 1, 1028.

Perl, D. P. and Moalem, S. (2006). Aluminum and Alzheimer's disease, a personal perspective after 25 years. *J Alzheimers Dis.* 9, 292-300.

Practicò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., and Lee, M. Y. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer Amyloidosis. *J Neurosci.* 21, 4183-4187.

Practicò, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J. Q., and Lee, M. Y. (2002). Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 16, 1138-1141.

Querfurth, H. W. and LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 362, 329-44.

Reiter, R. J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J.* 9, 526-533.

Reiter, R. J. (1998). Oxidative damage in the central nervous system. protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 56, 359-384.

Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Garcia, J. J., and Acuña-Castroviejo, D. (1998). Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 854, 410-424.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., and Calvo, J. R. (2002). Antioxidant capacity of melatonin. In *Handbook of antioxidants* (E. Cadenas and L. Packer, Eds.), 2nd ed., pp 565-613. Marcel Dekker AG, Basel, Switzerland.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J., and Czarnocki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol.* 50, 1129-1146.

Reiter, R. J., Tan, D. X., Gitto, E., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Leon, J., Manchester, L. C., Vijayalaxmi, K., E., and Kilic, U. (2004). Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. *Pol J Pharmacol.* 56, 159-170.

Reiter, R. J., Tan, D. X., and Maldonado, M. D. (2005). Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res.* 39, 215-216.

Religa, D., Strozyk, D., Cherny, R. A., Volitakis, I., Haroutunian, V., Winblad, B., Naslund, J., and Bush, A. J. (2006). Elevated cortical zinc in Alzheimer's disease. *Neurology*. 67, 69-75.

Ribes, D., Colomina, M. T., Vicens, P., and Domingo, J. L. (2008). Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 214, 293-300.

Ribes, D., Colomina, M. T., Vicens, P., and Domingo, J. L. (2010). Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure. *Curr Alzheimer Res*. 7, en premsa.

Richard, M. J., Portal, B., Meo, J., Coudray, C., Hadjian, A., and Favier, A. (1992). Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem*. 38, 704-709.

Rifat, S. L., Eastwood, M. R., McLachlan, D. R. C., and Corey, P. N. (1990). Effect of exposure of miners to aluminum powder. *Lancet*. 336, 1162-1165.

Roberts, N. B., Clough, A., Bellia, J. P., and Kim, J. Y. (1998). Increased absorption of aluminium from a normal dietary intake dementia. *J Inorg Biochem*. 69, 171-176.

Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R., Antolin, I., Herrera, F., Martin, V., and Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 36, 1-9.

Roig, J. L., Fuentes, S., Colomina, M. T., Vicens, P., and Domingo, J. L. (2006). Aluminum restraint stress and aging: Behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology*. 218, 112-124.

San, L.N., Uysal, H., Gokbel, H., Bediz, L.S., Sayal, A. (1997). Pulmonary function of workers in the aluminium industry. *Am J Ind Med*. 33, 305-307.

Sethi, P., Jyoti, A., Singh, R., Hussain, E., Sharma, D. (2008). Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology*. 29, 1069-1079.

Sharma, P., Mishra, K.P. (2006). Aluminum-induced maternal and developmental toxicity and oxidative stress in rat brain: response to combined administration of Tiron and glutathione. *Reprod Toxicol.* 21, 313-321.

Shaver, C. G., and Riddell, A. R. (1947). Lung changes associated with manufacture of alumina abrasives. *J Ind Hyg Toxicol.* 29, 145-157.

Shcherbatykh, I. and Carpenter, D. (2007). The role of metals in the etiologic of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 11, 191-205.

Shainkin-Kestenbaum, R., Adler, A.J., Berlyne, G.M., Caruso, C. (1989). Effect of aluminium on superoxide dismutase. *Clin Sci (Lond).* 77, 463-466.

Shi, B., and Haug.,A. (1990). Aluminum uptake by neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 55, 551-558.

Shigematsu, K., and McGeer, P. L. (1992). Accumulation of amyloid precursor protein in damaged neuronal processes and microglia following intracerebral administration of aluminum salts. *Brain Res.* 593, 117-123.

Siurin, S. A., Nikanov, A. N., and Rocheva, I. I. (2008). Long-term follow-up study of mortality and the incidence of cancer in a cohort of workers at a primary aluminum smelter in Sweden. *Med Tr Prom Ekol.* 9, 22-27.

Smith, D. G., Cappi, R., and Barnham, K. J. (2007). The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid b peptide. *Biochim Biophys Acta.* 1768, 1976-1990.

Smith, M. A., Casadeus, G., Joseph, J. A., and Perry, G. (2002). Serial review: causes and consequences of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 33, 1194-1199.

Soni, M. G., White, S. M., Flamm, W. G., and Burdock, G. A. (2001). Safety evaluation of dietary aluminum. *Regul Toxicol Pharm.* 33, 66-79.

Sorenson, J.R., Campbell, I.R., Tepper, L.B., Ling, R.D. (1974). Aluminum in the environment and human health. *Environ Health Perspect.* 8, 3-95.

Spofforth, J. (1921). Case of aluminium poisoning. *Lancet*. 1, 1301-1306.

Still, C. N., and Keller, P. (1980). On the incidence of primary degenerative dementia vs. water fluoride content in South Carolina. *Neurotoxicology*. 1, 125-131.

Struys-Ponsar, C., Kerkhofs, A., Gauthier, M., Soffié, M., and Bosch de Aguilar, P. (1997). Effects of aluminum exposure on behavioral parameters in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 4, 643-648.

Swaim, C. and Chainy, G. B. (1998). Effects of aluminum sulphate and citric acid ingestion on lipid peroxidation and on activities of superoxide dismutase and catalase in cerebral hemisphere and liver of developing young chicks. *Mol Cell Biochem*. 187, 163-172.

Swartz, R. (1985). Deferoxamine and aluminum removal. *Am J Kidney Dis*. 6, 358-364.

Szutowics, A. (2002). Aluminum Neurotoxicity. In Handbook of Neurotoxicology (E. J. Massaro, Ed.), pp 211-236. Humana Press, New Jersey.

Tan, D. X., Chen, L. D., Poeggeler, B., Manchester, L. C., and Reiter, R. J. (1993). Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*. 1, 57-60.

Tomás-Zapico, C., and Coto- Montes, A. (2005). A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. *J Pineal Res*. 39, 99-104.

Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Ueda, T., Cho, S., Honma, K., and Kondo, T. (1999). Melatonin induces g-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 27, 838-847.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 44-84.

Venugopal, B., and Luckey, T. D. (1978). Metal toxicity in mammals. Chemical toxicity of metals and metalloids. (no editors), Volume 2, Plenum Press, New York, NY.

Verstraeten, S.V., Aimo, L., Oteiza, P.I. (2008). Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol.* 82, 789-802.

Verstraeten, S. V., Nogueira, L. V., Schreier, S., and Oteiza, P. I. (1997). Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: role in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 338, 121-127.

Verstraeten, S. V., and Oteiza, P. I. (2000). Effects of Al³⁺ and related metals on membrane phase state and hydration: correlation with lipid oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 375, 340-346.

Vicens, P., Redolat, R., and Carrasco, M. C. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema.* 15, 539-544.

Vogt, T. (1986). Water quality and health: Study of possible relation between aluminium in drinking water and dementia. *Sosiale og Okonomiske Studier.* 61, 1-99.

Walton, J. R. (2007). A longitudinal study of rats chronically exposed to aluminum at human dietary levels. *Neurosci Lett.* 412, 29-33.

Walton, J. R. (2007b). An aluminum-based rat model for Alzheimer's disease exhibits oxidative damage, inhibition of PP2A activity, hyperphosphorylated tau, and granulovacuolar degeneration. *J Inorg Biochem.* 101, 1275-1284.

Wang, J., and Wang, Z. (2006). Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sin.* 27, 41-49.

Wegiel, J., Wang, K. C., Imaki, H., Rubenstein, R., Wronska, A., Osuchowski, M., Lipinski, W. J., Walker, L. C., and LeVine, H. (2001). The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice. *Neurobiol Aging.* 22, 49-61.

Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., and Korte, D. W. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem.* 184, 193-199.

Winklhofer, C., Steinhausen, C., Beck, E., Alvarez-Bruckmann, M., Kinzel, S., Ittel, T. H., and Nolte, E. (2000). Effect of iron status on the absorption, speciation and tissue distribution of aluminium in rats. *Nuc Inst Meth Phys Res B*. 172, 920-924.

Woodson, C.D. (1998). An interesting case of osteomalacia due to antacid use associated with stainable bone aluminium in a patient with normal renal function. *Bone*. 22, 695-698.

Xie, C. X., and Yokel, R. A. (1996). Aluminum facilitation of iron-mediated lipid peroxidation is dependent on substrate, pH, and aluminium and iron concentrations. *Arch Biochem Biophys*. 327, 222-226.

Yokel, R. A. (1994). Aluminum chelation: chemistry, clinical, and experimental studies and the search for alternatives to desferrioxamine. *J Toxicol Environ Health*. 41, 131-174.

Yokel, R. A. (2000). The toxicology of aluminum in the Brain: A Review. *Neurotoxicology*. 21, 813-828.

Yokel, R. A. (2002). Brain uptake, retention, and efflux of aluminum and manganese. *Environ Health Perspect*. 110, 699-704.

Yokel, R. A. (2002b). Aluminum chelation principles and recent advances. *Coord Chem Rev*. 228, 97-113.

Yokel, R. A. (2004). Aluminum. In *Elements and their compounds in the environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance* (E. Merian, M. Anke, M. Inhat, and M. Stoepler, Eds.), 2^a ed., Wiley-VCH, Weinheim.

Yokel, R. A. (2006). Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contributed to metal-induced neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 10, 223-253.

Yokel, R. A., and Florence, R. L. (2006). Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into a baked good, is lower than from water. *Toxicology*. 227, 86-93.

Yokel, R. A., Hicks, C. L., and Florence, R. L. (2008). Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in chesse. *Food Chem Toxicol*. 46, 2261-2266.

Yokel, R., Rhineheimer, S., Brauer, R., Sharma, P., Elmore, D., and McNamara, P. (2000). Brain aluminum clearance is slow. *Toxicol Sci*. 54, 35.

Yoshino, M., Ito, M., Haned, M., Tsubouchi, R., and Maurkami, K. (1999). Pro-oxidant action of aluminum ion-stimulation of iron-mediated lipid peroxidation y aluminum. *Biometals*. 12, 237-240.

Youdim, M. B., Stephenson, G., and Shachar, D. (2004). Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *Ann N Y Acad Sci*. 1012, 306-225.

Yumoto, S., Kakimi, S., Ohsaki, A., Ishikawa, A. (2009). Demostration of aluminium in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem*. 103, 1579-1584.

Zatta, P., Favarato, M., and Nicolini, M. (1993). Deposition of aluminum in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminum acetylacetonate. *Neuroreport*. 4, 1119-1120.

Zatta, P., Kiss, T., Suwalsky, M., and Berthon, G. (2002). Aluminium(III) as a promoter of cellular oxidation. *Coord Chem Rev*. 228, 271-284.

Zhang, Z., and Yu, C. X. (2002). Effect of melatonin on learning and memory impairment induced by aluminium chloride and its mechanism. *Acta Pharmaceutica Sin*. 37, 682-686.

Zheng, W. (2001). Neurotoxicology of the Brain Barrier System: New Implications. *Clin Toxicol*. 39, 711-719.

Zhuo, J., Prescott, S. L., Murray, M. E., and Zhang, H. (2007). Early discrimination reversal learning impairment and preserved spatial learning in a longitudinal study of Tg2576 APPsw mice. *Neurobiol Aging*. 28, 1248-1257.
