



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN ORAL A ALUMINIO A TRAVÉS DE LA DIETA EN RATONES TG2576. PAPEL PROTECTOR DE LA MELATONINA

Celeste Gisela Di Paolo Pereyra

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Evaluación de los efectos de la exposición crónica a aluminio a través de la dieta en ratones Tg2576. Papel protector de la melatonina.

Celeste Gisela Di Paolo
Pereyra

TESIS DOCTORAL

Dirigida por :

Dra. María Mercedes Gómez Arnaiz

Dr. José Luís Domingo Roig

Departamento de Psicología

REUS 2017



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD ROVIRA I VIRGILI

María Mercedes Gómez Arnaiz, Catedrática de Escuela Universitaria de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili y José Luís Domingo Roig Catedrático de Toxicología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira Virgili.

CERTIFICAN QUE:

La Tesis Doctoral titulada: "Evaluación de los efectos de la exposición crónica a aluminio a través de la dieta en ratones Tg2576. Papel protector de la melatonina." presentada por Celeste Gisela Di Paolo Pereyra, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos para optar al título de Doctor.

Y para que conste a los efectos que corresponda firman este certificado.

Reus, 30 de Junio de 2017.

Dra. María Mercedes Gómez Arnaiz

Dr. José Luís Domingo Roig

Agradecimientos:

Todos, en algún momento nos planteamos nuestro futuro de una forma realista pero soñadora a la vez. Para mí, ese momento fue al elegir carrera; me resultaba complicado elegir sin conocer de cerca cada carrera y el futuro que me esperaba después; así que como eso era imposible pensé “Si pudieras elegir ¿en qué quieres trabajar?”. Mi respuesta fue que quería ser investigadora y no sé muy bien por qué añadí “quiero investigar el Alzheimer” supongo que en ese momento habría escuchado, o leído algo; lo que sí sé es que desde siempre lo consideré una enfermedad cruel porque le quita al paciente la capacidad de recordar que lo que le pasa es porque está enfermo.

Acabé la carrera y la vida y las oportunidades me llevaron por otros caminos hasta que un día tuve la oportunidad real de empezar esta Tesis y vi lo cerca que estaba de este objetivo idílico de hacía años. Para mí ha sido toda una ilusión cumplida y pronto será también un reto cumplido. Cierro una gran etapa, la recordaré con el mismo cariño e ilusión con el que la he vivido.

Me gustaría aprovechar la ocasión para expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una manera u otra han contribuido a que yo haya podido vivir esta experiencia tal y como ha sido.

A mis directores el Dr. Domingo y la Dra. Gómez, por la paciencia, el esfuerzo, el tiempo que me han dedicado y por todo lo que me han enseñado; grandes profesionales y grandes personas. Ha sido todo un placer trabajar con ellos. Gracias en especial por este último esfuerzo contrarreloj.

También agradezco a la Dra. Cabré y la Dra. Colomina todo lo que he aprendido de sus explicaciones, los ratos compartidos en el laboratorio, sus consejos y ánimos.

A todos/as mis compañeros de laboratorio, de cafés, de problemas y soluciones; en especial a Tania, Jordi y a Ingrid (desde la distancia). Gracias por todas las veces que habéis estado ahí para mí.

Quiero agradecer a mis padres que me han guiado en este largo camino. Gracias por el cariño, el apoyo y esfuerzo de muchos años gracias al cual pude estudiar y dedicarme a lo que realmente me gusta. Mucho esfuerzo, muchos años... muchas gracias.

Gracias también a mi Cari por su paciencia, su ayuda y por esas noches a doble ordenador en que tus risas me daban compañía y un extra de fuerza para continuar.

En último lugar quiero agradecer muy especialmente a la primera persona que vio cómo admiraba el mundo de la investigación y creyó que yo también podía hacerlo, la que me ayudó a tener la oportunidad de realizar esta Tesis. Compañera y amiga, Dianeta, las dos sabemos que sin ti no habría sido posible.

Todos vosotros me habéis traído hasta aquí así que ¡Os estaré siempre agradecida!

MI AGRADECIMIENTO también al “Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)”, Ministerio de Sanidad, Gobierno de España, por proporcionar la financiación de este estudio mediante la concesión nº PI050622.



1. ÍNDICE Y ABREVIATURAS

1- Índice y abreviaturas	6-11
1.1 Índice.	8
1.2 Abreviaturas.	10
2- Introducción	12-23
2.1 Enfermedad de Alzheimer.	14
2.2 Historia de la Enfermedad de Alzheimer.	14
2.3 Patología de la Enfermedad de Alzheimer.	15
2.4 Metales y Alzheimer.	16
2.5 Aluminio y Alzheimer.	17
2.6 Terapias contra el Alzheimer.	21
3- Hipótesis y Objetivos	24-27
3.1 Hipótesis.	26
3.2 Objetivos.	27
4- Material y métodos	28-41
4.1 Materiales, reactivos y animales de experimentación:	30
Elección del modelo animal.	30
Animales.	30
Reactivos.	31
Materiales.	33
4.2 Metodología utilizada:	36
Grupos de tratamiento.	36
Preparación y administración de los tratamientos.	37
Aplicación de los test de comportamiento.	37
Sacrificio y toma de muestras.	38
Determinación de metales.	39
Determinación de β -amiloide.	39
Determinación de Caspasa-3 y SOD2.	40

5- Resultados	42-91
5.1 Chronic exposure to aluminum and melatonin through the diet: Neurobehavioral effects in a transgenic mouse model of Alzheimer Disease.	44
5.2 Melatonin does not modify the concentration of different metals in A β PP transgenic mice.	56
5.3 Long term oral administration of melatonin does not improve beta-amyloid deposition, caspase 3 and SOD2 levels in Tg2576 mice.	66
6- Discusión	92-103
6.1 Efectos Neuroconductuales de la exposición crónica a Al y melatonina	94
6.2 Efecto de la melatonina en la concentración de Al y otros metales	97
6.3 Efecto de la melatonina en la deposición de β -amiloide, niveles de caspasa-3 y SOD2	100
6.4 Resumen General	103
7- Conclusiones	104-107
8- Bibliografía	108-129

ABREVIATURAS:

A β : Beta amiloide

A β 1-40: Beta-amiloide de 40 residuos

A β 1-42: Beta-amiloide de 40 residuos

A β PP: Proteína precursora de la beta amiloide

AD: Enfermedad de Alzheimer

Act: β -actina

Al: Aluminio

AlCit-W: Animales wild-type con dieta suplementada con aluminio y citrato

AlCit-Tg: Animales Tg con dieta suplementada con aluminio y citrato

AlCitMel-W: Animales wild-type con dieta suplementada con aluminio y citrato y además con melatonina

AlCitMel-Tg: Animales Tg con dieta suplementada con aluminio y citrato y además con melatonina

BHE: Barrera hematoencefálica

C-W: Animales wild-type con dieta control

C-Tg: Animales Tg con dieta control

Ca²⁺: Ión de calcio

Casp-3: Caspasa 3

Cit-W: Animales wild-type con dieta suplementada con citrato

Cit-Tg: Animales Tg dieta suplementada con citrato

Cu: Cobre

ELISA: Enzyme linked immuno assay

ETC: Cadena de transporte de electrones

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

Fe: Hierro

ICP-MS: Espectrofotometría atómica de plasma acoplado

JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

Mel: Melatonina

Mel-W: Animales wild-type suplementados con melatonina

Mel-Tg: Animales Tg suplementados con melatonina

MWM: Laberinto de agua de Morris

Na⁺: lón de sodio

OF: Campo abierto

PSEN1: Presenilina 1

PSEN2: Presenilina 2

PTWI: Provisional tolerable week intake; consumo semanal provisionalmente aceptable

PVDF: Difluoruro de polivinilideno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SOD2: (o Mn-SOD) Superóxido dismutasa mitocondrial

Tg: Ratones transgénicos APPSWE (Tg2576)

W: Ratones no transgénicos (wild-type)

WHO: World Health Organization

Zn: Zinc

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedad de Alzheimer.

La Enfermedad de Alzheimer (AD) es un trastorno neurodegenerativo progresivo, irreversible y de origen hasta ahora desconocido. Se caracteriza clínicamente por el deterioro de las funciones cognitivas y cambios conductuales, lo cuales afectan a la autonomía de los pacientes de forma gradual, hasta llegar a una pérdida total en último término de las funciones mentales (Lambert et al., 2009).

Las principales características fisiopatológicas de la AD son la deposición de péptidos β -amiloide ($A\beta$) formando placas, degeneración neurofibrilar y metabolismo anormal de algunos metales. El aumento de los niveles de $A\beta$ y la evidencia de daño oxidativo son marcadores neuropatológicos tempranos de la AD (Matsubara et al., 2003, Guo et al., 2013, Wang et al., 2016, Shukla, 2017, Wang y Wang, 2017).

2.2 Historia de la Enfermedad de Alzheimer.

La Enfermedad de Alzheimer recibe su nombre del Doctor Alois Alzheimer que fue el primero en describir la enfermedad en 1907, basándose en los datos clínicos e histopatológicos de una mujer (Frau Auguste D.) que murió a los 55 años de edad, tras sufrir una demencia progresiva.

En la actualidad, todavía no se conoce la causa o causas que provocan la aparición de la AD, ya que puede presentarse en dos formas. La variante "familiar" de la enfermedad es la menos frecuente, 5-15% de los casos, y tiene un origen genético claro. Puede darse en individuos jóvenes (25-30 años), y consiste en mutaciones en los genes $A\beta$ PP, PSEN1 y PSEN2, localizados en los cromosomas 21, 14 y 1 respectivamente (Lambert et al., 2009; Walton, 2012a, Walton, 2013; Di Paolo et al., 2014a).

Por otra parte, la mayoría de los casos de AD (85-95%) se presentan de forma esporádica, siendo en ésta variante en la que la etiología de la AD no está aun totalmente entendida. A pesar de eso, una de las hipótesis más aceptadas es la toxicidad de los depósitos de $A\beta$ (Newman 2007; Walton, 2012a; Walton, 2013; Yokel, 2013; Di Paolo et al., 2014a; Hendrix et al., 2015; Xio et al., 2017).

A pesar de no haber podido encontrar todavía la causa, a lo largo de los años se han ido identificando diversos factores de riesgo:

- El sexo, ya que la AD es más frecuente en mujeres que en hombres (y no solo porque la esperanza de vida sea mayor en éstas) (Maynard et al., 2006; Fernandez Martinez et al., 2008).

- Los antecedentes familiares. Incluso dejando de lado la variante genética de la enfermedad, sigue siendo más probable sufrir la AD cuando se tienen antecedentes familiares. Respondería a una susceptibilidad y no a una herencia directa (Walton, 2013).
- La dieta (Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Yokel, 2013).
- La exposición a algunos elementos como pueden ser: aluminio (Al), cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn), aumenta las probabilidades de sufrir enfermedades neurodegenerativas (Maynard et al., 2006; Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Kawahara y Kato-Negishi, 2011; Rusina et al., 2011; Walton, 2013; Yokel, 2013; Exley y Vickers, 2014; Cao et al., 2017; Mirza et al., 2017).
- Factores diversos como la raza, la residencia geográfica, priones o virus, interactuarían con otros factores para contribuir de alguna forma a la aparición de la enfermedad (Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Walton, 2013).

La AD afecta actualmente al 5-7% de las personas de más de 65 años y teniendo en cuenta el envejecimiento progresivo de nuestra sociedad, se prevé que el número se duplique, e incluso triplique, en los próximos años constituyendo un problema de Salud Pública aún mayor que en la actualidad.

2.3 Patología de la Enfermedad de Alzheimer.

A pesar de que la velocidad de evolución de la AD es muy variable, se describen tres etapas: leve, moderada y grave, en función de la sintomatología del paciente. En la primera fase, se empieza a detectar cierta apatía y pequeñas pérdidas de memoria, como puede ser la repetición de preguntas, aunque la autonomía y la vida cotidiana del paciente no se ven alteradas. Es en la fase moderada de la enfermedad cuando las pérdidas de memoria comienzan a ser importantes y dificultan la vida diaria de los pacientes. En la fase grave, aparece dificultad para dormir, trastornos de conducta importantes, cambios en la personalidad y pérdida de la autosuficiencia del paciente.

La caracterización de los síntomas descritos para cada etapa, es clave para seleccionar los medicamentos a utilizar en la misma, dado que al no disponer de medicamentos específicos para detener o revertir la AD, se tratan únicamente sus síntomas (Cao et al., 2017).

La sintomatología de la enfermedad se explica muy bien observando las lesiones del cerebro de los pacientes. No todo el cerebro se ve afectado a la vez ni por igual. Las lesiones se encuentran en áreas muy definidas, comenzando siempre en el hipocampo y la amígdala (áreas donde se

gestionan la memoria y las relaciones afectivas). Conforme va avanzando la enfermedad, se afectan zonas del córtex. Es en éstas zonas se encuentran las placas seniles o placas neuríticas, que son acúmulos de proteína beta-amiloide ($A\beta$) en su forma no soluble, formando láminas, ovillos o marañas constituidos por neurofibrillas de la proteína tau (Braak y Braak, 1991; Kovács et al., 2001; Matsubara et al., 2003; Cheng 2006; Wang y Wang 2006; Newman 2007; Massaad et al., 2009; Walton, 2009; Walton, 2012a; Walton, 2012b; Mold et al., 2013; Selvaraju et al., 2014; Wu et al., 2016; Cao et al., 2017; Mendivil-Perez et al., 2017).

El péptido $A\beta$ se genera tras la acción de diferentes secretasas (α , β ó γ) sobre la glicoproteína de transmembrana, conocida como proteína precursora de amiloide o APP. Dependiendo de la secretasa que actúe, se generan diferentes isoformas de entre 39 y 42 aminoácidos. Entre ellas, la $A\beta$ 1-40 es la más soluble y abundante en el líquido cefalorraquídeo, mientras la isoforma $A\beta$ 1-42 es la menos abundante y la más insoluble. En los pacientes de AD, la isoforma $A\beta$ 1-42 es la que se sintetiza mayoritariamente y la más tóxica, debido a la falta de solubilidad, la cual hace que bajo condiciones experimentales *in vitro*, forme agregados de fibrillas amiloides insolubles y láminas β , que son prácticamente indistinguibles del amiloide acumulado en cerebros con AD (Matsubara et al., 2003, Fan et al., 2013; Liu et al., 2013).

$A\beta$ induce estrés oxidativo, neurotoxicidad, degeneración neuronal y apoptosis, tanto directamente por la regulación positiva enzimas pro-apoptóticas, como también por la regulación negativa de enzimas anti-apoptóticas (Ghribi et al., 2002, He et al., 2010, Fan et al., 2013, Tay et al., 2013, O'Neal-Moffitt et al., 2015, Mukda et al., 2016, Wang et al., 2016; Xiao et al., 2017).

La neurotoxicidad de la $A\beta$ 1-42 está relacionada con la aparición de daño oxidativo mitocondrial, causado por las reacciones redox que se facilitan al unirse la $A\beta$ 1-42 a diferentes metales (Matsubara et al., 2003; Ma et al., 2011; Murakami et al., 2011; Fan et al., 2013; Flynn y Melov 2013; Liu et al., 2013; Mold et al., 2013; Stumm et al., 2013; Wu et al., 2016).

2.4 Metales y Alzheimer.

La hipótesis sobre la interacción de los metales con otros factores para causar la AD, ha ganado importancia en las décadas recientes, gracias a estudios en los que se han detectado niveles hasta 3-5 veces mas elevados para algunos metales (Cu, Fe, Zn, Al) en cerebros de pacientes con AD, y mas concretamente en las placas amiloides, así como evidencias de alteraciones en la homeostasis de dichos metales en cerebro, lo que podría contribuir a la

AD (Domingo, 2006; Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Duce y Bush, 2010; Akiyama et al., 2012; Roberts et al., 2012; Yokel, 2012b; Decker y Muñoz-Torrero, 2016).

La A β es una metaloproteína capaz de interactuar con diferentes metales. La acumulación de éstos en el cerebro, así como la presencia de radicales libres, provocan la acumulación de A β , la cual causa daño oxidativo, que a su vez genera una retroalimentación positiva, dando lugar a más producción y acumulación de A β . El Al también aumenta la formación de A β , y promueve su agregación, aunque los mecanismos subyacentes a la formación de las láminas β en el cerebro humano son todavía desconocidos (Kawahara et al., 2001; Rodella et al., 2008; Walton, 2012a, Di Paolo et al., 2014a; Wang et al., 2016).

Por su parte, Cu, Fe y Zn forman agregados de A β de forma rápida, siendo la interacción que establece A β con el Al la más compleja. En primer lugar, establece un complejo Al-A β 1-42, el cual es más citotóxico que la propia proteína. La formación de este complejo cambia también la estructura terciaria de la proteína, favoreciendo la estructura de hoja-beta (β -sheet) que da lugar a la agregación de la A β . El complejo Al-A β 1-42 inhibe también la degradación de la A β ya formada, desplazando al calcio de las proteinasas encargadas de su degradación. Frenar la neurotoxicidad inducida por la A β está considerado actualmente como la mejor estrategia para el tratamiento de la AD (Kawahara et al., 2001; Maynard et al., 2002; Bush, 2003; Maynard et al., 2005; Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Rodella et al., 2008; Duce y Bush, 2010; Roberts et al., 2012; Walton, 2012a; Di Paolo et al., 2014a; Wang et al., 2016; Xiao et al., 2017).

2.5 Aluminio y Alzheimer.

El Al es el tercer elemento más abundante en la tierra, después del silicio y el oxígeno. Sin embargo, a pesar de su abundancia y ubicuidad, no es un metal esencial, ni se le atribuye ninguna función biológica.

Los seres humanos están continuamente expuestos a Al, que puede provenir de fuentes naturales como la erosión de suelos, el aire, el agua, o los alimentos, donde se encuentra a concentraciones relativamente bajas, o puede venir también de fuentes antropogénicas. Las fábricas de producción de Al, la minería, y la industria, son fuentes potenciales de exposición a Al. El Al está presente en la fabricación de papel, en la industria de la construcción, en la fabricación de explosivos, en la industria farmacéutica, en la elaboración de anti-transpirantes, desodorantes, en productos cosméticos, en vacunas y en medicamentos de gran consumo "over-the-counter" como antiácidos. También

se utiliza Al en ingeniería electrónica, transporte, la fabricación de utensilios para el hogar, electrodomésticos y materiales de embalaje (Yokel, 2000; ATSDR 2008; Yumoto et al., 2009; Walton, 2012a; Yokel, 2012a; Yokel, 2012b; Walton 2013; Exley y Vickers, 2014).

A pesar de lo anterior, la mayor y más usual fuente de exposición a Al para la población general, es la dieta, la cual aporta entre 3,5 y 10 mg de Al por día (Yokel, 2012a). El Al (presente en suelo, aire y agua) se transfiere de forma natural a las plantas y animales, pasando así a la cadena alimentaria. El Al es también ampliamente utilizado por la industria alimentaria como aditivo: colorantes, agentes impulsores, anti aglomerantes, ajustadores de pH, etc... Es en esta forma en la que se da la mayor exposición a Al, ya que los alimentos procesados aportan a la dieta alrededor de 400 mg de Al/kg de comida (WHO, 1989; Yokel y Florence, 2006; Arnich et al., 2012; Walton, 2012a; Fekete et al., 2013; Walton, 2013; Yokel, 2013).

Sin embargo, tan solo una pequeña cantidad de todo ese Al ingerido a diario podría ser realmente absorbida por el cuerpo si el Al se presenta de forma elemental, dada la baja capacidad de absorción del organismo humano. A este respecto, se han realizado estudios que han demostrado que la absorción del Al incrementa al formar complejos tales como maltolatos, ascorbatos, succinatos, lactatos o citratos, entre otros. La formación del complejo Al-citrato, for ejemplo, aumenta la absorción de Al de 5 a 10 veces, tanto en humanos como en animales (Domingo et al., 1993; Zhou et al., 2008; García et al., 2009; Walton, 2012b). Eso sucede gracias a que el citrato mantiene un pH óptimo de absorción, forma un complejo de bajo peso molecular con el Al, e incrementa la permeabilidad del mucus intestinal, de forma que el complejo puede absorberse, traspasar las paredes del intestino y acceder al torrente sanguíneo (Domingo et al., 1993; Whitehead et al., 1997; Kawahara et al., 2001; Rodella et al., 2008; Walton, 2012a; Yokel, 2013; Di Paolo et al. , 2014a; Di Paolo et al., 2014b; Wang et al., 2016). Todo esto genera un problema, dado que el ácido cítrico es un componente muy común en la dieta, que se ingiere tanto de fuentes naturales como las frutas y verduras, como artificiales (aditivos alimentarios) donde es ampliamente utilizado (Golub y Keen, 1999; Yilmaz et al., 2012; Magaia et al., 2013).

El 60% del Al absorbido se acumula en los huesos, el 25% en los pulmones, el 10% en los músculos, el 3% en el hígado y alrededor de un 1% es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica (BHE) y llegar al cerebro (Krewski et al., 2007).

Aunque a simple vista la cantidad de Al que puede llegar al cerebro es aparentemente baja, el metal acumula gradualmente a lo largo de la vida, lo que podría ser suficiente para provocar neurotoxicidad y contribuir con el

tiempo a la generación de la AD sobre todo, en individuos especialmente susceptibles. En todo caso, la aparición y gravedad de los efectos adversos provocados por el Al dependerán de la dosis, el tiempo y la ruta de exposición, así como de la solubilidad del compuesto de Al (Walton, 2009; Walton, 2012a).

Se ha involucrado también al Al en diversas patologías tales como la anemia microcítica, la osteomalacia, la encefalopatía inducida por diálisis, siendo asimismo el primer metal en ser relacionado con enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica, la demencia Parkinsoniana de Guam, o la propia AD (Esparza et al., 2003; Exley, 2004; Esparza et al., 2005; Gómez et al., 2005; Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Gómez et al., 2008; Kumar et al., 2009; Li et al., 2012; Walton, 2012a; Walton, 2012b; Yokel, 2012b; Prakash y Sudhandiran, 2015; Cao et al., 2017; King et al., 2017).

Hasta la fecha, la relación entre el Al y la AD continúa siendo objeto de controversia con resultados que la soportan y otros que no la ratifican. A pesar de ello, es ampliamente aceptado que el Al es un agente neurotóxico, capaz de causar alteraciones cognitivas al penetrar en el cerebro. Por tanto, se considera importante continuar investigando los mecanismos por los que se produce la neurotoxicidad, y poder así proponer como frenarla.

Se ha demostrado, que la exposición a Al puede ser considerada un factor de riesgo para desarrollar trastornos neurodegenerativos como la AD, ya que precede y estimula la amiloidogénesis, la cual induce a su vez estrés oxidativo, neurotoxicidad y apoptosis (Masumura et al., 2000; Kawahara et al., 2001; Rodella et al., 2008; Walton, 2012a; Flynn y Melov, 2013; Miller et al., 2014; Walton, 2014; Allagui et al., 2015; Al-Olayan et al., 2015; Wang et al., 2016).

Más del 90% de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ocurre en las mitocondrias (Dasuri et al., 2013, Yan et al., 2013). Esta producción de ROS se genera cuando los electrones se escapan de su cadena de transporte (ETC), y reaccionan con el oxígeno (O_2). De hecho, entre el 1 y el 5% de todo el O_2 utilizado en los complejos I y III del ETC escapa como superóxido. Así, la superóxido dismutasa de las mitocondrias (SOD2) cataliza la reacción de transformación del superóxido a oxígeno diatómico y peróxido de hidrógeno. La glutatión peroxidasa y la catalasa, actúan a su vez como defensas antioxidantes adicionales, convirtiendo el peróxido de hidrógeno en agua. Por ello, es obvio que las mitocondrias desempeñan un papel clave en el funcionamiento y la supervivencia de las neuronas cerebrales (Dasuri et al., 2013; Flynn y Melov, 2013; Yan et al., 2013). En relación a ello, se ha observado disfunción mitocondrial y cambios en la localización y movilidad de las enzimas mitocondriales en enfermedades neurodegenerativas como la AD

(O'Neal-Moffit et al., 2015, Rudnitskaya et al., 2015, Kandimalla et al., 2016, Prakash et al., 2017, Shukla et al., 2017).

Otra de las características de las enfermedades neurodegenerativas es la muerte por apoptosis de las células del sistema nervioso central (SNC). La apoptosis es una forma de muerte celular que se caracteriza por la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, brotes en la membrana citoplasmática y la contracción celular. Las vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas, así como las vías de señales de supervivencia anti-apoptóticas, desempeñan un papel fundamental en la neurodegeneración. Son numerosos los estudios que muestran que la apoptosis está implicada y aumentada en la pérdida neuronal durante la progresión de la AD. Asimismo, los iones metálicos y la A β (ampliamente implicados en la AD), aumentan la apoptosis (Behl, 2000; Vila y Przedborski 2003; He et al., 2010; El-Missiry et al., 2014).

El Al se acumula en las neuronas, inhibe el intercambio de Na⁺ / Ca²⁺, e induce así una acumulación excesiva de Ca²⁺, conduciendo a la permeabilidad de las membranas de las mitocondrias, a la liberación de citocromo c, y a la posterior apoptosis por activación de la familia de las caspasas, proteasas que resultan críticas para la apoptosis durante el desarrollo de la AD. (Ding et al., 2015, Prakash y Sudhandiran, 2015; Kandimalla et al., 2016, Zhao et al., 2016, Wang y Wang, 2017). Las caspasas son una familia de cisteín-proteasas, enzimas muy promiscuas, que se sintetizan en forma inactiva, y que se activan por proteólisis, produciendo las caspasas iniciadoras: caspasa-2, -8, -9 y -10, que a su vez escinden (y por tanto activan) las caspasas efectoras: caspasa-3, -6 y -7. La activación de las cascadas de caspasas, y particularmente la activación de la caspasa-3 (Casp-3), está fuertemente ligada a varios procesos degenerativos en el envejecimiento del cerebro y en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas tales como AD (Ghribi et al., 2002; D'Amelio et al., 2012; Snigdha et al., 2014; Juraver-Geslin y Durand, 2015).

Principalmente dos vías pueden activar la Casp-3; intrínseca (o mitocondrial) y extrínseca (o citosólica). Estas vías son impulsadas respectivamente por la caspasa-9 y la caspasa-8. La Casp-3 juega un papel extremadamente importante en la apoptosis neuronal, y su activación se considera el evento terminal precedente a la muerte celular. Existen evidencias de niveles más altos de Casp-3 en el cerebro de pacientes afectados por la AD en comparación con sus controles de la misma edad. Los efectos patológicos de la A β y las ROS parecen fomentar y aumentar la muerte celular por activación de la Casp-3 en cerebros envejecidos (He et al., 2010; Snigdha et al., 2014; Juraver-Geslin y Durand, 2015).

La relación entre las enzimas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas es lo que decide si la célula vive o muere (Dasuri et al., 2013; Juraver-Geslin y Durand, 2015).

2.6 Terapias contra el Alzheimer.

En la actualidad, no se dispone aún de medicamentos efectivos para frenar o revertir los daños generados por la AD. La única estrategia con la que contamos actualmente es intentar prevenir la enfermedad, evitando en la medida de lo posible, los factores de riesgo conocidos y aprovechar los factores protectores que se van descubriendo. Una dieta como la Mediterránea, con antioxidantes naturales, ácidos omega-3, fosfatos y vitaminas B6 y B12, unido a un estilo de vida saludable con actividad física que aumenta el riego sanguíneo, el metabolismo del cerebro, y reduce la cantidad de lípidos en sangre, así como la realización de actividades intelectuales de cualquier tipo que ayudan a mantener el cerebro activo, ayudan a la prevención (Gulcin et al., 2003; Kuller et al., 2007; Antunes Wilhelm et al., 2013; Selvaraju et al., 2014; Decker y Muñoz-Torrero, 2016).

Se siguen investigando las causas que provocan la aparición de la AD, así como los mecanismos y vías por las que se produce el daño a fin de poder encontrar un tratamiento paliativo o curativo. Es generalmente aceptado, que la reducción en la formación de A β y la prevención del daño oxidativo, son el objetivo terapéutico más importante en la AD. Son muchos los fármacos y sustancias que se están ensayando. Agentes quelantes, antiinflamatorios, hipocolesterolemiantes, antioxidantes, vacunas, tratamientos hormonales, e incluso tratamientos con células madre, han sido propuestos en los últimos años, como terapias para detener o reducir la disminución cognitiva, e impedir así el progreso de la enfermedad (Limson et al., 1998; Matsubara et al., 2003; Harrison et al. 2004; Kuller et al., 2007; Bubenik y Konturek, 2011; Baño et al., 2012; Flynn y Melov, 2013; Liu et al., 2013; Stumm et al., 2013; Hendrix et al., 2015; Mendivil-Perez et al., 2017).

El tratamiento con antioxidantes permitiría neutralizar los radicales libres y disminuir el daño oxidativo. El uso en concreto de un antioxidante que se encuentra de forma natural en el organismo, como es la melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (Mel), parece incluso más provechoso, al facilitarse el traspaso de la BHE y de las membranas celulares para llegar al interior celular. La Mel (subproducto de la serotonina) es una de las principales señales del sistema nervioso central, así como un potente y conocido agente antioxidante de acción directa e indirecta (mediante la activación de otros antioxidantes

como la Vitamina E o los β -carotenos). Tiene propiedades anti-amiloideas, anti-inflamatorias, anti-apoptóticas y neuroprotectoras. Entre las muchas e interesantes propiedades de la Mel destacan la regulación de los ritmos circadianos, la neutralización de los radicales libres, la prevención de la peroxidación lipídica y de otros procesos destructivos relacionados con el estrés oxidativo, la mejora de la respuesta inmunológica, la inhibición de la oxidación, y la capacidad de actuar como quelante del Al (Reiter, 1995; Matsubara et al., 2003; García et al., 2010a; García et al., 2010b; Zhu et al., 2015; Nayki et al., 2016; Mendivil-Perez et al., 2017; Yu et al., 2017; Zhai et al., 2017).

La Mel se sintetiza principalmente en la glándula pineal localizada en el diencefalo bajo la influencia del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, siendo sus concentraciones inversamente proporcionales a la cantidad de luz, de la época del año y sobre todo de la edad. Las cantidades de Mel disminuyen con la edad, aunque no está claro si ello es causa o efecto del envejecimiento. Además, se ha observado que esta disminución es más pronunciada en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Concretamente, en pacientes de AD, la reducción se da de forma paralela al avance de la enfermedad y se acompaña de la reducción de la expresión de los receptores de membrana para Mel (Konturek, 2011, Baño et al., 2012, Corrales et al., 2013, Mauriz et al., 2013, Di Paolo et al., 2014a; Allagui et al., 2015; Liu et al., 2017; Yu et al., 2017; Zhai et al., 2017).

Actualmente, parece que la Mel puede inducir reducciones en la deposición de A β , inhibir el procesamiento amiloidogénico de A β PP por la estimulación de la α -secretasa, con la consiguiente reducción tanto de la β - como de la γ -secretasas a nivel transcripcional. Además, la Mel parece mejorar la estructura de las mitocondrias, las cuales son orgánulos muy sensible al estrés oxidativo, y que además están dañadas en la AD (O'Neal-Moffit et al., 2015, Rudnitskaya et al., 2015, Kandimalla et al., 2016, Prakash et al., 2017, Shukla et al., 2017).

Diversos estudios proponen el uso de la Mel como agente terapéutico en la prevención de enfermedades neurodegenerativas donde se dan procesos de generación de radicales libres: Parkinson y la AD (Matsubara et al., 2003; Zatta et al., 2003; Quinn et al., 2005; Bubenik y Konturek, 2011; Baño et al., 2012; Antunes et al., 2013; Mendivil-Perez et al., 2017).

Se ha descrito que las mitocondrias desempeñan un papel crítico en la función neuroprotectora de la Mel en AD, dado que son lugares diana para la acumulación de Mel, encontrándose ahí los niveles celulares más altos de Mel. Se espera que la Mel reduzca los niveles de Casp-3, y evite varios procesos

implicados en la neurodegeneración, tales como la apoptosis, mediante la inhibición de las vías apoptóticas intrínsecas (Martín et al., 2000; He et al., 2010; El-Missiry et al., 2014; Mehrzadi et al., 2016; Mendivil-Perez et al., 2017; Ramos et al., 2017; Zhai et al., 2017).

Basado en lo anterior, la Mel ha sido propuesta como una posible terapia frente a la AD (Matsubara et al., 2003; Quinn et al., 2005; Baño et al., 2012, Miller et al., 2014; Liu et al., 2017). En nuestro laboratorio, decidimos evaluar su efecto usando uno de los modelos animales para AD más comunes: el ratón transgénico APPSWE 2576 (Tg), el cual está diseñado para simular varias de las características de la enfermedad. Estos ratones llevan incorporado el gen humano que codifica la proteína precursora de amiloide humana (APP), y que favorece la acción de la γ -secretasa en vez de la α -secretasa, dando lugar a acúmulos de $A\beta$ en el cerebro de forma difusa o formando placas de $A\beta$. Estos depósitos comienzan aproximadamente a los 9-12 meses de edad de los animales. También presentan déficits cognitivos, de aprendizaje y memoria espacial, daños por acción de radicales libres, estrés oxidativo y apoptosis. (Ribes et al., 2008; Flynn y Melov, 2013; Di Paolo et al., 2014a).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis.

En décadas recientes, la implicación del Al en enfermedades neurodegenerativas tales como la AD ha sido un tema de gran interés y relevancia científica, aunque desde luego también muy controvertido. A pesar de que no se ha podido establecer una relación causal directa entre Al y AD, diversos estudios muestran que el Al, por sus efectos pro-oxidantes y neurotóxicos, puede favorecer la evolución de los daños por estrés oxidativo de la AD.

Teniendo en cuenta la gran importancia social que va adquiriendo esta enfermedad, debido al envejecimiento de la población y al hecho de que hasta ahora, no se conocen las causas que la provocan, ni tampoco se dispone de medicamentos específicos capaces de curarla o detener su avance, resulta evidente la importancia de investigar los potenciales mecanismos que conducen a la AD. Entre ellos, figura la posible relación que se establecería con el Al tanto a nivel bioquímico como a nivel cognitivo. Encontrar una molécula capaz de frenar o revertir estos efectos es, actualmente, todo un reto científico.

A primera vista, la melatonina parece una molécula con muchas posibilidades, dado que puede atravesar las barreras fisiológicas y posee (entre otras) propiedades antioxidantes, quelantes y neuroprotectoras, las cuales pueden ayudar a combatir el daño producido por radicales libres, el estrés oxidativo y la toxicidad de los acúmulos de A β presentes en el cerebro de pacientes de Alzheimer.

Basándonos en lo anterior, la hipótesis de este trabajo ha sido la siguiente:

La melatonina es capaz de proteger al cerebro contra los daños bioquímicos y cognitivos ocasionados por la exposición crónica a aluminio en un modelo de ratón transgénico para la Enfermedad de Alzheimer.

3.2 Objetivos.

El objetivo general de esta tesis ha sido evaluar los efectos tóxicos y neurotóxicos, así como los cambios cognitivos y de conducta, derivados de la exposición crónica a Al mediante la dieta, en un modelo animal para la AD.

Se han definido los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la actividad motora general de los ratones Tg2576 a los 18 meses de edad, después de haber sido expuestos crónicamente a una dosis de 1 mg Al/g de dieta y un 3.2% de ácido cítrico.
- Evaluar los daños sobre la memoria, así como el posible efecto beneficioso de la Mel para amortiguar estos daños.
- Determinar la concentración de Al y otros metales esenciales (Cu, Fe, Mn y Zn) en diferentes zonas encefálicas (hipocampo, córtex y cerebelo), así como en otros tejidos corporales (hígado, riñón, bazo y fémur).
- Determinar si la Mel es capaz de modificar la homeostasis de dichos metales.
- Evaluar si la Mel puede modificar la concentración de A β en córtex e hipocampo de ratones Tg2576.
- Analizar los niveles de Casp-3 y SOD2 como marcadores de apoptosis neuronal, para valorar el posible daño producido por el tratamiento con Al.
- Determinar si la Mel muestra capacidad antiapoptótica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Materiales, reactivos y animales de experimentación:

Elección del modelo animal para el estudio de la AD.

Se escogieron como modelo los ratones heterocigotos APPSWE o Tg2576 (Tg). La principal característica de este modelo es la sobre expresión el precursor de la proteína amiloide humana (APP) y la tendencia a que la proteína generada sea procesada por las β -secretasas y no por las α -secretasas. Esto genera altas cantidades de la proteína A β en su forma insoluble que se acumula en el cerebro y por ello son uno de los modelos más utilizados para el estudio de la amiloidosis tipo Alzheimer.

El gen APP humano que se añade a los ratones Tg tiene una doble mutación asociada a una variante hereditaria y prematura de la AD descubierta en Suiza y por ello reciben el nombre APPSWE (Swedish amiloid precursor protein). El resultado de esta doble mutación es el cambio de dos aminoácidos en la APP: la lisina de la posición 670 se sustituye por una asparraguina y la metionina 671 por una leucina pasando a denominarse APP₆₉₅. Estos cambios de aminoácidos unidos al procesamiento por las β -secretasas provocan la aparición de altas concentraciones de las isoformas A β 1-40 y A β 1-42 que se acumulan en el cerebro y a la aparición de placas amiloideas. Las placas de A β aparecen a partir de los 9 meses de edad mayoritariamente en córtex y en algunas zonas del hipocampo y aumentan rápidamente de los 10 a 21 meses (Kawarabayashi et al., 2001; Ribes et al., 2008). Estos cambios histopatológicos se pueden correlacionar con déficits cognitivos de aprendizaje y memoria descritos a partir de los 9 meses de edad de los animales (Hsiao et al., 1996; Chapman et al., 1999).

Por tanto, teniendo en cuenta que este modelo animal presenta similitudes con las características histopatológicas y cognitivas de la AD humana, consideraremos que son un buen modelo para el estudio de la neurotoxicidad del Al y su posible contribución al desarrollo de la AD así como para evaluar el posible papel protector de la Mel.

Animales.

Se utilizaron ratones Tg heterocigotos procedentes de Taconic Europa A/S (Denmark) y ratones de su correspondiente cepa no transgénica (C57BL6/SJL) de Charles River (France). Después del periodo de cuarentena y tras la autorización para cría "cross breeding" de Taconic Europa, se inicia la cría en nuestro estabulario con 15 machos y 60 hembras. Las crías se mantuvieron en la jaula de las madres hasta el destete (a los 21 días de edad) y a partir de ese momento fueron sexadas y genotipadas. Para el experimento se utilizaron las

hembras por su menor agresividad que evita tener que enjaularlas de forma individual cosa que, por otro lado tampoco está recomendado dado el estrés que sufren los animales en aislamiento. Una vez realizado el genotipado se separaron las hembras por grupos según el genotipo Tg y wild-type (W).

Los animales se alojaron en el estabulario de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad Rovira i Virgili que está homologado por el Departamento de Sanidad Animal de la Generalitat de Catalunya nº de registro: T9900003. Para el alojamiento se utilizaron jaulas Makrolon y se controlaron las condiciones ambientales. La temperatura fue de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa de 40-60% y los ciclos automáticos de luz/oscuridad fueron de 12 horas. Los animales recibieron en todo momento comida y agua de bebida "ad libitum" proporcionada 2 o 3 veces por semana por el personal del estabulario en colaboración con el experimentador; también se vigiló el estado de salud de los animales ateniéndose a los criterios de punto final establecidos en el procedimiento nº 6778 de la Generalitat de Catalunya.

Los procedimientos de este estudio han sido aprobados por el Comité Ético de experimentación animal de la Universidad Rovira i Virgili y siguen las normas y directrices para la manipulación de animales de experimentación de la Generalitat de Catalunya.

Reactivos.

Para el tratamiento de los animales:

- Dieta estándar de mantenimiento (Panlab, Barcelona, España).
- Dieta suplementada con ácido cítrico (32g de ácido cítrico/ Kg de dieta) (Harlan Ibérica, Barcelona, España).
- Dieta suplementada con lactato de aluminio y ácido cítrico (1mg Al/g de dieta y 32g de ácido cítrico/ Kg de dieta) (Harlan Ibérica, Barcelona, España).
- Melatonina ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).

Para el genotipado:

- Tris Base (2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate ACS) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Proteínasa K (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).

- Cloruro de sodio (NaCl) (LabKem, Barcelona, España).
- Etanol (C₂H₇OH) (Panreac, Barcelona, España).

Para el sacrificio de los animales:

- Imalgene (Ketamina hidroclicuro, 100mg/ml, Merial, Toulouse, Francia).
- Xilagestic (Xilacina hidroclicuro 20 mg/ml, Laboratorios Calier, Barcelona, España).

Para medir la concentración de metales en los tejidos:

- Ácido nítrico 65% suprapur (HNO₃) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Peróxido de hidrógeno ENSURE 30% (H₂O₂) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA).

Para la determinación de Aβ acumulada:

- AEBSF (4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Guanidine hydrochloride (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Cloruro de potasio (KCl) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Fosfato sódico básico (Na₂HPO₄) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Fosfato potásico ácido (KH₂PO₄) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Hidrógenocarbonato de sodio (NaHCO₃) (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Human Aβ40 ELISA kit KMB3481 (Invitrogen, Frederick, USA).
- Human Aβ42 ELISA kit KMB3441 (Invitrogen, Frederick, USA).
- Reactivo de Bradford (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Albúmina de suero bobino (BSA) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).

Para medir de la concentración de Casp-3 y SOD2:

- Bio-Rad DC Protein Assay Reagents Package Kit (BioRad, California, USA).
- TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit 12% (BioRad, California, USA).
- Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit (BioRad, California, USA).

- Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA).
- SOD2 (D3X8F) XP® Rabbit mAb (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA).
- Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA).
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA).
- Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards (BioRad, California, USA).
- Tris-HCl (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Glicerol (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Blau de bromofenol (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Alemania).
- β -Mercaptoetanol (2-mercaptoetanol) (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestlé, Barcelona, España).
- Tween ® 20 pure (Polyoxyethylene sorbitan monolaureate) (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Alemania).
- Glycine (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- APS (Ammonium persulfate) (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Alemania).
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina) (BioRad, California, USA).
- ImmunStar™ Western C™ Substrate Kit (BioRad, California, USA).
- Trizma® hydrochloride (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Tritón ® X 100 (Panreac, Barcelona, España).
- Cóctel Inhibidor de proteasas (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).
- Cóctel Inhibidor de fosfatasas (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).

Materiales.

Generales:

- Balanza analítica (Sartorius AG, Göttingen, Alemania).
- Medidor de pH (Crison Instruments, SA., Barcelona, Espanya).
- Microcentrífuga 4204 (A.L.C. International, Milano, Italia).
- Ultracentrífuga 2-16PK (Sigma ChemicalCoA., St.Louis, USA).

Para el genotipado:

- Fuente de electroforesis Apelex PS 304 minipac II (Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA).
- Temociclador Perkin-Elmer 2720 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).
- Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, USA).

Para las pruebas de comportamiento:

- Campo Abierto (Open Field) (OF): se trata de un recinto cuadrado de madera de 60cmx60cm con una pared de 47cm de altura y abierto por la parte superior.

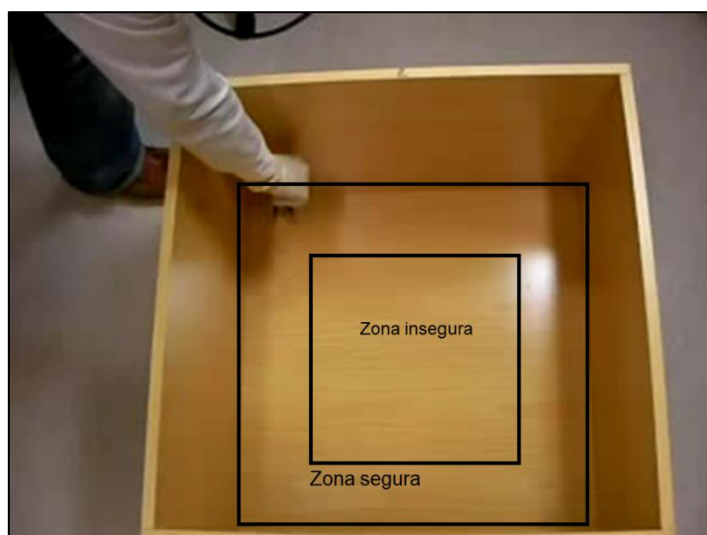


Figura 1: Open Field.

- Laberinto de agua de Morris (Water maze) (MWM): piscina redonda de 1m de diámetro con pared de 60cm de altura que permite la colocación de una pequeña plataforma redonda de 6cm sumergida 1,5cm por debajo del nivel del agua donde el animal puede pararse y dejar de nadar. Las paredes exteriores de alrededor de la piscina deben ser blancas y lisas; en cada una se dibuja una figura geométrica diferente de forma que permiten al animal crear un mapa cognitivo para recordar la posición de la plataforma (que al estar sumergida queda invisible).



Figura 2: MWM, señales externas y cámara de detección.

- Cámara de video y software informático. Para la detección y análisis del movimiento de los animales en el OF y en el MWM se utilizó una cámara de video (Sony CCD-IRIS model) acoplada a un ordenador con el programas Etho-Vision (Nodus Information Technologies, Wageningen, Países Bajos).

Para evaluar la concentración de metales en los tejidos:

- Microondas para digestiones con ácidos Milestone Start D 230V-50Hz (In Vitro Serving Science and Medicine, VIC, Australia).
- Material Estándar de Referencia NIST (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA).
- Espectrofotómetro atómico de plasma acoplado controlado por ordenador Perkin Elmer Elan 6000 (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

Para la determinación de A β :

- Espectrofotómetro de placas LT 4000 (Labtech, Guadalajara, Méjico).
- ELISA kit para A β 1-40 y A β 1-42 (BioSource, Camarillo CA, USA).

Para la determinación por Western Blot de Casp-3 y SOD2:

- Sistema de electroforesis PowerPac Basic (BioRad, California, USA).
- Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad, California, USA).
- ChemiDoc™ XRS+ Imaging System (BioRad, California, USA).

4.2 Metodología utilizada:

Grupos de tratamiento.

A partir de los 4 meses de edad, los animales se pesaron y se separaron en los grupos de estudio que se detallan en la tabla 1. Durante dos meses a partir del inicio de los correspondientes tratamientos se controló el peso de los animales y el consumo de agua y comida para comprobar que comían con normalidad. También se controló el número de animales que murieron durante el tratamiento.

El número total de animales al inicio del estudio fue de 211 (111 wild-type y 100 Tg). En los grupos Cit-W y AICit-W no hubo muertes, la mortalidad del resto de grupos de animales wild-type fue del 5.55%, 3.33% y 10% en C-W, Mel-W y AICitMel-W respectivamente.

En los animales Tg la mortalidad fue mayor, que los datos proporcionados por la empresa suministradora del modelo animal, se esperaba una mortalidad de alrededor del 20%. En nuestro estudio, los grupos C-Tg, Cit-Tg, Mel-Tg, AICit-Tg y AICitMel-Tg mostraron unos porcentajes de mortalidad de 22%, 33%, 26.3%, 26.3% y 33% respectivamente lo que nos deja un total de 179 animales repartidos según consta a continuación en la tabla 1.

Grupo	Genotipo	Tratamiento	nº final de animales
Ctr-W	W	Control	19
Ctr-Tg	Tg	Control	14
Cit-W	W	Citrato	22
Cit-Tg	Tg	Citrato	12
Mel-W	W	Melatonina	26
Mel-Tg	Tg	Melatonina	17
AICit-W	W	Aluminio y Citrato	22
AICit-Tg	Tg	Aluminio y Citrato	17
AICitMel-W	W	Aluminio, Citrato y Melatonina	18
AICitMel-Tg	Tg	Aluminio, Citrato y Melatonina	12

Tabla 1: Grupos de tratamiento.

Preparación y administración de los tratamientos.

Los tratamientos se administraron durante 14 meses de dos formas. El Al y el Cit estaban en el pienso en forma de lactato de aluminio y ácido cítrico (respectivamente). En cambio, la Mel se añadía al agua de bebida (en una dosis de 10mg Mel/ Kg ratón/ día) y para facilitar su solubilización se añadió un 0.066% de etanol que también se añadió al agua de los grupos sin Mel. Las botellas que contenían Mel se pintaron de color negro para evitar la degradación de la Mel con la luz (Golub y Keen, 1999; Nogués et al., 2006; Gómez et al., 2008).

Aplicación de los test de comportamiento:

Las pruebas de comportamiento, Open Field y Morris Water Maze se realizaron durante el último mes de tratamiento a todos los animales.

Open Field.

El OF evalúa parámetros de actividad motora de los animales expuestos a un nuevo ambiente y se basa en la tendencia natural de los animales a explorar un nuevo ambiente y el conflicto que ocasiona con el miedo o ansiedad que les generan los espacios abiertos. Por ello en el OF se delimitan dos zonas. La periferia o zona “segura” corresponde al área de 10cm justo al lado de las paredes y la zona central o zona “insegura” todo el centro menos estos 10cm (ver figura 1).

El procedimiento de la prueba consiste en un único intento de 15 minutos en los que se coloca el animal en el OF y se le permite moverse libremente por todo el espacio. Su desplazamiento se graba para analizar el tiempo y espacio recorrido en cada zona como medida de la actividad horizontal y el número de *rearing* como medida de la actividad vertical. Los resultados se dividen en tres periodos de 5 minutos para analizar la habituación al nuevo ambiente. Después de cada animal y antes de poner al siguiente se limpia el OF con etanol al 70% para evitar los las señales olfativas.

Morris Water Maze.

Se utilizó un laberinto de agua similar al descrito por primera vez por Morris (1984) y a este diseño se le ha añadido una pared rotatoria interior para evitar que el animal se guíe por pequeñas imperfecciones de los bordes de la piscina.

Esta pared y la posición de salida del animal van variando en cada intento de cada día de ensayo de forma que la única señal fidedigna de la localización de la plataforma sean las señales de las paredes exteriores.

La prueba consiste en 10 días de ensayo con 2 intentos al día en los que el animal debe nadar hasta encontrar la plataforma sumergida. Dispone de un tiempo máximo de 90 segundos para localizarla y una vez localizada debe permanecer en ella 30 segundos hasta ser recogido por el experimentador. Si transcurrido el tiempo máximo el animal no ha localizado la plataforma es colocado en ella por el experimentador manteniéndolo allí durante 30 segundos.

Durante la duración de la prueba y mediante el sistema computarizado Ethovision de Noldus Technology se evaluó la latencia de escape (tiempo que tarda en localizar la plataforma) y la distancia recorrida durante los ensayos de adquisición.

Los días 3, 5, 8 y 10 después de los entrenamientos diarios y transcurridas 48 horas después del último día de adquisición, se realizaron ensayos de prueba. En estos ensayos de prueba la plataforma se retira y se permite al animal explorar el laberinto durante 60 segundos.

En estos ensayos se valoró el tiempo que pasaron los animales en el cuadrante donde anteriormente se localizaba la plataforma.

Sacrificio y toma de muestras.

Al final de las pruebas de comportamiento, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg peso corporal) y xilacina (10 mg/kg peso corporal) disuelta en solución de NaCl al 0.9%. Se diseccionó a los animales y se recogieron muestras de hígado, riñón, bazo y fémur así como de córtex, cerebelo e hipocampo de los dos hemisferios cerebrales. Las muestras de cerebro fueron congeladas a -80°C y las de órganos a -20°C .

Se utilizaron 6-8 muestras, por grupo experimental, de hígado, riñón, bazo, fémur así como de córtex, cerebelo e hipocampo para el análisis de metales (Al, Fe, Mn, Cu y Zn) y 5 muestras por grupo de córtex e hipocampo se destinaron al análisis de Casp-3, SOD2 y concentración de A β 1-40 y A β 1-42 (solo en los grupos Tg).

Determinación de metales.

La espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una técnica de análisis capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica. Consiste en un equipo dotado de un monocromador posterior a la muestra y una serie de detectores en diferentes posiciones del plano focal dedicados a cada elemento. Su principal característica es que posee unos límites de detección a niveles de ppt para la mayoría de los elementos, cosa que la hace una técnica ideal para el análisis de elementos traza.

La muestra, que ha de ser líquida, es vaporizada e ionizada gracias a un plasma de Argón. Los iones una vez formados pasan al espectrómetro de masas donde son separados y detectados. Comparando con las técnicas de absorción atómica, la ICP-MS tiene mayor precisión, sensibilidad y el análisis es más rápido.

Las muestras analizadas con esta técnica fueron: hígado, riñón, bazo, fémur, córtex, cerebelo e hipocampo. Todas las muestras fueron digeridas con 0.5 ml de ácido nítrico suprapur en microinserts y recipientes de teflón que se introducían en el horno microondas a 185°C y 1000W durante 30 minutos. Finalmente, los digeridos se llevaban a un volumen final de 5 ml con agua mili-Q y se congelaban hasta su análisis.

Todo el material necesario para las digestiones era previamente limpiado con agua destilada y agua mili-Q; con ácido nítrico suprapur al 10% 12 horas y otra vez con agua mili-Q para evitar cualquier foco de contaminación.

La fiabilidad de la técnica se comprobó mediante el uso de estándares de referencia preparados en nuestro laboratorio a partir de cerebro de rata y estándares de referencia internacional del National Institute of Standards and Technology (NIST material de referencia 1577b de hígado bobino).

Para cada muestra se analizaron la cantidad de Al, Fe, Cu, Mn y Zn. Los límites de detección fueron: 1µg/ Kg para el Al, 0.010µg/ g para el Fe, 0.10µg/ Kg para el Mn y el Cu, 0.020µg/ g para el Zn. También se analizó la cantidad de Si en la dieta y en el agua de bebida, el límite de detección fue de 0.050µg/ ml.

Determinación de β-amiloide.

La determinación de la cantidad de Aβ se realizó mediante la técnica ELISA (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable

como cambio de color; en ocasiones, con el fin de reducir los costos del ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría la cantidad de antígeno en la muestra.

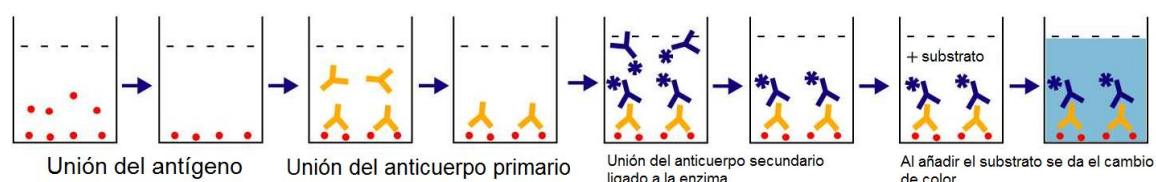


Figura 3: esquema realización ELISA.

Mediante esta técnica se determinó la cantidad de $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42 humana. El análisis se realizó en muestras de córtex e hipocampo solo de los grupos Tg ya que los ratones de tipo wild no expresan $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42 humana. Para expresar los resultados es necesario relacionar la cantidad de $A\beta$ con la cantidad de proteína total presente en la muestra tras el proceso de homogeneización. Esto se llevó a cabo mediante el método Bradford.

El método Bradford (Bradford, 1976) se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Brilliant Blue G que presenta un máximo de absorción a 595 nm. Al mezclar el homogenado de cada muestra con el reactivo de Bradford la absorbancia resultante (Abs) es proporcional a la cantidad de proteína en la muestra. Para poder establecer la relación entre concentración y las Abs se utilizó una recta patrón con albúmina de suero bobino (BSA).

Los resultados se expresan en nmol $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42/ g tejido, pmol $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42/ mg proteína total y también se calculó la ratio $A\beta$ 1-42/ $A\beta$ 1-40.

Determinación de caspasa-3 y SOD2.

La determinación de la cantidad de proteína Casp-3 y SOD2 se realizó mediante Western Blot. El Western blot o inmunoblot, es hoy en día una técnica imprescindible en varios campos de la biología, como la biología molecular, la bioquímica, la biotecnología o la inmunología. Su función es detectar proteínas específicas en una muestra determinada (ej. un extracto tisular). Consta de tres pasos: en el primero y mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura,

hidrofobicidad, etc. Hay casi tantas posibilidades como tipos de electroforesis existen. En el segundo las proteínas ya separadas son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) y por último la proteína elegida se detecta con anticuerpos específicos contra ella y mediante una segunda unión antígeno-anticuerpo con actividad enzimática o fluorescencia (entre otros métodos). Así se puede estudiar la cantidad de la proteína elegida en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

Este análisis se realizó en muestras de córtex e hipocampo de todos los grupos usando la β -actina (Act) como proteína de referencia. Los resultados se expresan como ratio de Casp-3/Act y SOD2/Act.

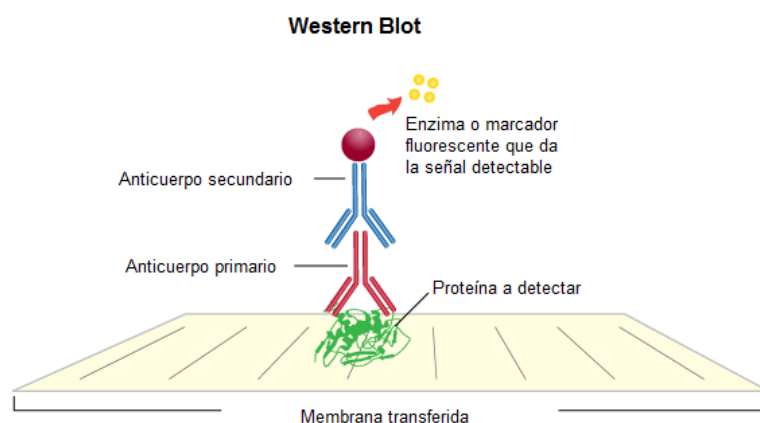


Figura 4: Esquema Western Blot análisis

Para poder realizar un Western blot es necesario conocer previamente la concentración de proteína total en las muestras a analizar; para ello se utilizó el método Lowry.

El método de Lowry es una técnica colorimétrica que permite calcular la concentración de proteínas totales presentes en una disolución o extracto biológico. El método se basa en el empleo de dos reactivos. El Reactivo A o reactivo de Biuret reacciona con las moléculas que tengan varios enlaces peptídicos consecutivos dando lugar a complejos solubles que presentan un color azul pálido. El Reactivo B o reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los aminoácidos de las proteínas que lleven en su cadena lateral grupos fenólicos dando lugar a un color azul intenso. La intensidad del color producido en total se mide con un espectrofotómetro y es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Para poder establecer la relación entre concentración y Abs se utilizó una recta patrón con BSA.

5. RESULTADOS

5.1 Chronic exposure to aluminum and melatonin through the diet: Neurobehavioral effects in a transgenic mouse model of Alzheimer disease.

Celeste Di Paolo, Ingrid Reverte, Maria Teresa Colomina, José L. Domingo, Mercedes Gómez.

Food and Chemical Toxicology 69 (2014) 320–329.

Resumen:

El aluminio (Al) es un conocido agente neurotóxico implicado en la etiología de algunas enfermedades neurodegenerativas severas como por ejemplo la Enfermedad de Alzheimer (AD). Los antioxidantes como la melatonina, pueden proteger a las neuronas del daño producido por la AD. El ratón transgénico APPSWE2576 (o Tg2576) es uno de los modelos animales más utilizados para simular los daños producidos por la AD. En el presente estudio, ratones wild-type y Tg2576 fueron expuestos mediante la dieta y durante 14 meses a Al, melatonina y ácido cítrico así como a todas las posibles combinaciones entre ellos. A los 17 meses de edad se evaluó el comportamiento de los animales mediante las pruebas de Campo Abierto (Open Field) y el Laberinto de agua de Morris (Morris Water Maze). Los animales transgénicos expuestos a melatonina y los expuestos a Al, citrato y melatonina mostraron una buena adquisición. No se observaron efectos en la adquisición del laberinto de agua de Morris en los animales wild-type. En relación a la retención durante la adquisición, solo los animales wild-type tratados con melatonina y los Tg2576 tratados con Al, citrato y melatonina mostraron retención de la tarea durante la adquisición. Solo los ratones de los grupos control wild-type y los Tg2576 tratados con aluminio+ácido cítrico+ melatonina mostraron una buena retención a largo plazo. La melatonina mejoró el aprendizaje y la memoria espacial de los ratones Tg2576 expuestos a aluminio.

5.2 Melatonin does not modify the concentration of different metals in AbPP transgenic mice.

Celeste Di Paolo, María Cabré, José L. Domingo, Mercedes Gómez.

Food and Chemical Toxicology 70 (2014) 252–259.

Resumen:

Los metales como el Al, el Fe, el Cu y el Zn han sido implicados en la etiología de ciertos desórdenes neurodegenerativos. Por otra parte, es ampliamente conocido que el citrato favorece la absorción del Al procedente de la dieta y que la melatonina puede unirse a diversos metales y disminuir la producción de ROS. En este estudio, se han determinado las concentraciones de Al, Fe, Cu, Zn y Mn en diferentes tejidos de ratones Tg2576 tratados con Al. Hembras Tg2576 y de la correspondiente cepa no transgénicas fueron expuestas a 1mg Al/ g de dieta y a un 3.2% de citrato así como a 10mg/Kg peso/día de melatonina durante 14 meses. A los 18 meses de edad, se midió la concentración de los metales en fémur, hígado, riñón y bazo al igual que en tres regiones del cerebro. En el grupo de Al y citrato el nivel de Al fue superior en el hipocampo que en el córtex o el cerebelo; en relación a los otros tejidos, la concentración de Al en el hueso fue superior que en hígado, riñón o bazo. Los presentes resultados muestran que la exposición a Al y citrato no produce cambios relevantes en la concentración de metales en función del genotipo. Además, la co-administración de melatonina no modifica significativamente la concentración de metales en ninguno de los tejidos estudiados. Los actuales resultados no apoyan la hipótesis de que la melatonina pueda disminuir la concentración de Al y Fe en los tejidos estudiados.

5.3 Long-term oral administration of melatonin does not improve beta-amyloid deposition, caspase 3 and SOD2 levels in aluminum-treated Tg2576 mice

C. Di Paolo, J. Blanco, M. Cabré, T. García, M. Gómez, J.L. Domingo.

Aceptado por: Trace Elements and Electrolytes 01-Agosto-2017.

Número de referencia: TEM1500.

De: Zidek, Walter <Walter.Zidek@charite.de>

Envíat el: dimarts, 1 d'agost de 2017 8:26

Per a: José Luis Domingo Roig

A/c: 'Joerg Feistle'

Tema: your submission to TEE

Dear Professor Domingo,

thank you very much for submitting your manuscript entitled "Long-term oral administration of melatonin does not improve beta-amyloid deposition, caspase 3 and SOD2 levels in aluminum-treated Tg2576 mice" to TRACE ELEMENTS AND ELECTROLYTES. It has been seen by expert members of the Editorial Board. I am delighted to say that we will accept this manuscript for publication in the Journal. It will be forwarded to the publisher for further processing. You will be informed on the status of publication by the publisher. Thank you very much for giving us the opportunity to have this fine piece of work in the JOURNAL.

Sincerely yours

Dr. W. Zidek, Editor

Resumen:

Objetivo: La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la producción y deposición de péptido β amiloide ($A\beta$) y la degeneración neurofibrilar. Se ha demostrado ampliamente que la exposición a Al puede ser considerada un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad. La β -amiloide induce estrés oxidativo, neurotoxicidad y apoptosis. Por otro lado, la melatonina es un potente antioxidante y se ha encontrado disminución de los niveles de melatonina en los pacientes de la enfermedad de Alzheimer en relación con la progresión de la enfermedad.

Por ello, la restauración de los niveles adecuados de melatonina se considera una buena estrategia contra la enfermedad de Alzheimer. Material y métodos: En el presente estudio se evaluó la cantidad de β -amiloiide soluble e insoluble ($A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42 respectivamente) utilizando un ensayo ELISA en córtex e hipocampo de ratones Tg2576 y también los niveles de proteína de la principal caspasa proapoptótica (caspasa-3) y la proteína antiapoptótica SOD2 mediante un análisis de Western Blot del córtex e hipocampo de ratones wild-type y Tg2576. Los animales fueron crónicamente expuestos a Al y melatonina a través de la dieta y del agua de bebida, respectivamente. Resultados: La cantidad de $A\beta$ 1-40 fue superior que la de $A\beta$ 1-42 en los tejidos cerebrales. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Respecto a la Casp-3 y la SOD2, se encontró una interacción (genotipo x tratamiento) en los dos tejidos pero tampoco se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Conclusión: Los resultados del presente estudio no corroboraron las propiedades anti-amiloidogénicas y anti-apoptóticas de la melatonina. Se necesitará más investigación para confirmar las tendencias observadas.

Long-term oral administration of melatonin does not improve beta-amyloid deposition, caspase 3 and SOD2 levels in aluminum-treated Tg2576 mice

C. Di Paolo¹, J. Blanco², M. Cabré³, T. García^{3,1}, M. Gómez^{3,1}, J.L. Domingo¹

¹Laboratory of Toxicology and Environmental Health; ²Physiology Unit; ³Biochemistry Unit.

School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalonia, Spain.

Correspondence to

Professor Jose L. Domingo. Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Catalonia, Spain.

joseluis.domingo@urv.cat

Abstract:

Objective: Alzheimer's disease (AD) is characterized by the production and deposition of amyloid- β peptide ($A\beta$) and neurofibrillary degeneration. It has been demonstrated that aluminum (Al) may be considered as a risk factor for developing the disease, while it is well established that $A\beta$ induces oxidative stress, neurotoxicity and apoptosis. On the other hand, melatonin is a potent antioxidant, whose levels are reduced in patients of AD, in relation with the progression of the disease. Therefore, restoring the suitable melatonin levels could be considered a good strategy against AD. **Materials and Methods:** The quantity of soluble and insoluble $A\beta$ ($A\beta$ 1-40 and $A\beta$ 1-42 respectively), the main pro-apoptotic caspase (caspase-3), and the anti-apoptotic SOD2 protein levels in cortex and hippocampus of Tg2576 mice were evaluated. Animals were chronically exposed to Al and melatonin from diet and drinking water, respectively. **Results:** The quantity of $A\beta$ 40 was higher than the quantity of $A\beta$ 42 in brain tissues. However, no significant differences between groups were found. Regarding Casp-3 and SOD2, an interaction "genotype x treatment" was found in both tissues tested, but no significant differences between groups of treatment were noted. **Conclusion:** The results of the present study did not corroborate the anti-amyloidogenic and anti-apoptotic properties of melatonin. Further studies are required to confirm the tendencies here observed.

Key words

Aluminum - melatonin - amyloid- β - Caspase-3 – SOD2

Introduction

Alzheimer Disease (AD) is a chronic, progressive and prevalent neurodegenerative disorder characterized by the loss of higher cognitive functions and an associated loss of memory. Main AD hallmarks are the deposition of amyloid β -peptide ($A\beta$) forming plaques, neurofibrillary degeneration, and abnormal trace elements metabolism. Increased levels of $A\beta$ and evidence of oxidative damage are early neuropathological markers of AD [1-5]. Brains with AD show extensive accumulation of $A\beta$ forming fibrils and plaques although this process is still unknown [1, 6-8].

The etiology of AD is due to environmental and genetic factors. The genetic factors involve aberrant metabolism of the amyloid- β protein precursor ($A\beta$ PP) and its amyloid- β peptide ($A\beta$) cleavage product, while several metal neurotoxicants had been largely proposed as environmental contributors [9-12].

Metals such as lead, mercury and aluminum have been suggested to be involved in the etiology of AD. However, lead has not been considered a suitable candidate because its neurotoxicity preferentially affecting children. In turn, mercury was a suitable candidate because mercury levels were found to be twice higher in AD patients in comparison with controls. However, it was finally discarded because mercury concentrations do not progressively accumulate in human brains with increasing age. In contrast, aluminum does accumulate in human brains in an age-dependent manner. Although very little is known about the mechanisms aluminum has been proposed as an environmental risk factor in AD [10, 13, 14].

Aluminum (Al) toxicity depends on its chemical form of administration and its solubility. Thus, some Al salts such as maltolate, ascorbate, succinate, lactate or citrate, are much more easily absorbed. Specifically, citric acid increases Al absorption from 5-10 times, both in humans and animals, having an easy access to the bloodstream and reaching the brain [11, 12, 15-20]. Al administration increases $A\beta$ formation and promotes its aggregation. However, the mechanisms underlying the β sheets formation in the human brain are not well known yet [9, 12, 21-23].

$A\beta$ is the product of the cleavage of $A\beta$ PP by β - and γ - secretases. Under *in vitro* experimental conditions, $A\beta$ aggregates spontaneously into insoluble amyloid fibrils and β sheets, which are virtually indistinguishable from the amyloid that accumulates in brains of AD patients [1, 24-26]. $A\beta$ induces oxidative stress, neurotoxicity, neuronal degeneration and apoptosis, directly and by the up-regulation of pro-apoptotic enzymes and the down-regulation of the anti-apoptotic ones [3, 26-31]. A relationship between mitochondrial oxidative stress and progression of plaques deposition has been also found [7, 32-34].

Oxidative stress is often implicated in a wide range of pathological processes. Nowadays, it is considered a key factor of neurodegenerative disorders such as AD, because it precedes and stimulates amyloidogenesis in Tg2576 mice [34-39]. More than the 90% of reactive oxygen species (ROS) production occurs in mitochondria [35, 40]. This ROS production is generated when electrons leak out of the electron transport chain (ETC) and react with dioxygen (O_2). In

fact, between 1 and 5% of all O_2 used in complexes I and III of the ETC escapes as superoxide. In response, superoxide dismutase in mitochondria (Mn-SOD or SOD2) catalyzes a reaction changing superoxide to diatomic oxygen and hydrogen peroxide. In turn, glutathione peroxidases and catalase act as additional antioxidant defenses by converting the hydrogen peroxide in water. Due to it, mitochondria plays a key role in the functioning and survival of neurons in the brain [34, 35, 40].

It is generally accepted that reducing amyloid formation and preventing oxidative damage are among the most important therapeutic target in AD. Therefore, the use of antioxidants to stop or to reduce the cognitive decline caused oxidative damage is being proved [1, 8, 24, 25, 34, 41-43].

Melatonin (Mel) is a by-product of serotonin, being one of the main output signals of the central nervous system with antioxidant, anti-amyloid, anti-inflammatory, anti-apoptotic and neuroprotective properties. Previous investigations have shown that Mel decreases during the aging process, having patients with AD more profound reductions of this hormone [1, 12, 38, 41, 42, 44-48].

Regarding AD, it has been demonstrated that Mel induce clear reductions in $A\beta$ deposition in hippocampus and cortex (*in vivo* and *in vitro* studies). It has also non-amyloidogenic properties inhibiting the amyloidogenic processing of $A\beta$ PP by stimulating α -secretase, and consequently, downregulating β - and γ - secretases at the transcriptional level. Mel acts as an antioxidant by itself. However, it has been also reported that Mel elevates the expression of several others antioxidants in various tissues. Moreover, Mel improves the ultrastructure of mitochondria which is very sensitive to oxidative stress, being impaired in AD. Mitochondria dysfunction and changes in mitochondrial enzymes, localization and mobility, seem to occur in many neurodegenerative disorders such as AD [4, 30, 49-51].

Apoptosis, a form of cell death, is characterized by chromatin condensation, nuclear fragmentation, cytoplasmic membrane blebbing and cell shrinkage. Apoptotic cell death in the central nervous system is a typical feature of neurodegenerative diseases. The intrinsic and extrinsic apoptotic pathways, and the antiapoptotic survival signal pathways, play critical roles in neurodegeneration. Extensive evidence shows that apoptosis is involved in neuronal loss during the progression of AD [28, 52, 53]. Moreover, metal ions and $A\beta$ (largely implicated in AD) are demonstrated to increase apoptosis. It has been demonstrated that Al can be accumulated in neurons following cell depolarization, inhibiting Na^+ / Ca^{2+} exchange, and thereby inducing an excessive accumulation of Ca^{2+} . This fact leads the cytochrome c release, and subsequently, apoptosis by activation of the caspase family, which are found to be critical during the course of AD development. In addition, Al appears to have a significant role in the induction of apoptosis and mitochondria dysfunction [5, 50, 54].

The caspases are a family of cysteine proteases, a very promiscuous enzymes, which are synthesized as inactive zymogens and activated by proteolysis producing the initiator caspases (caspase-2,-8,-9 and -10), which cleave the executioner caspases (-3,-6 and -7). Activation of the caspase cascades, and particularly caspase-3 (Casp-3), is strongly implicated in several

degenerative processes, in the aging brain, as well as in pathogenesis of degenerative disorders such as AD [27, 55-57]. Two pathways can mainly activate Casp-3 intrinsic (mitochondrial) and extrinsic (cytosolic) driven, respectively, by caspase-9 and -8. Casp-3 plays an extremely important role in neuronal apoptosis, being considered the terminal event preceding cell death. First evidences showed higher Casp-3 levels in AD brain in relation to its age-matched controls. The cell death through Casp-3 activation in aged brains appears to be mediated and exacerbated by the pathological effects of A β and ROS [28, 56, 57]. The ratio between pro-apoptotic and anti-apoptotic enzymes is what decides whether cells live or die [40, 57].

On the other hand, it has been reported that Mel prevents several processes involved in neurodegeneration such as apoptosis, by inhibiting the intrinsic apoptotic pathways [28, 58]. Moreover, mitochondria has been identified as a target for Mel, where its highest levels are found. For that reason, mitochondria plays a critical role in the neuroprotective function of Mel in AD [28, 59]. Based on the above characteristics, Mel has been proposed as a possible treatment for AD [1, 36, 42, 60].

The purpose of the present study, was to test the effects of Mel using one of the most popular animal models of AD: the APPSWE 2576 (Tg2576) transgenic mouse. We evaluated the concentration of A β , Casp-3 and SOD2 in samples of hippocampus and cortex of Tg2576 female mice chronically exposed to Al -compared to wild-type mice- in order to elucidate the possible protector role of Mel administration.

Material and methods

Chemicals

Aluminum and citric acid were administered through the diet. Regular chow was supplemented with Al lactate (1 mg of Al per g of chow) (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) [18, 61] and 3.2% of citric acid (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) [62]. Melatonin (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) was dissolved in absolute ethanol and added to the drinking water to a final ethanol concentration of 0.066%, being administered in feeding bottles protected from the light. Control drinking water contained also a 0.066% of ethanol. A fresh Mel solution was prepared twice a week.

Animals and treatment

The main characteristics of this animal model is the over expression of the A β polypeptide gene and the favoring of the cleavage of A β PP by the enzyme β -secretase against α -secretase. This leads to an excess of A β products, which finally deposit and form senile plaques. These deposits begin approximately at 9–12 months of age [12, 34, 63].

Adult female transgenic (Tg2576) and wild-type mice were used. Parental APPSWE hemizygous male mice were obtained from Taconic Europe (Lille Skensved, Denmark). After a quarantine week, males were backcrossed with female mice (C57BL6/SJL) obtained from Charles River (Saint-Germain-Nuelles, France). At 2 months of age, female mice were selected, genotyped using mouse tail, and separated according to the genotype. Mice were housed in an animal room maintained at 22 ± 2 °C, a relative humidity of $50 \pm 10\%$, and a 12-hr light/dark automatic light cycle (light: 08.00–20.00 h). All animals were allowed free access to food and water.

From 3 months of age, mice were feed with one of three different diets during 14 consecutive months: regular chow, regular chow supplemented with citric acid (3.2%), and regular chow supplemented with both citric acid (3.2%) and Al lactate (1 mg Al/g chow). Melatonin-treated animals received also 10 mg/kg/day of Mel. Animals were divided into 10 experimental groups: control wild-type (C-W), control Tg2576 (C-Tg), melatonin wild-type (Mel-W), melatonin Tg2576 (Mel-Tg), citric acid wild-type (Cit-W), citric acid Tg2576 (Cit-Tg), Al lactate and citric acid wild-type (AlCit-W), Al lactate and citric acid Tg2576 (AlCit-Tg), Al lactate and citric acid plus melatonin wild-type (AlCitMel-W), and Al lactate and citric acid plus melatonin Tg2576 (AlCitMel-Tg).

At the end of the treatment at 18 months of age, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg body weight) and xylazine (10 mg/kg body weight) dissolved in 0.9% saline. Animals were then euthanized through a cervical dislocation, being brains removed and dissected. Samples of hippocampus and cortex were obtained, being frozen at -80°C until subsequent analyses.

The procedures used in the current study were approved and carried out according to the Ethics Committee of Animal Research, "Rovira i Virgili" University (Tarragona, Catalonia, Spain) and the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care.

A β ELISA determination

Two forms of A β were determined: A β 1-40, a 40 residues peptide, soluble and healthy, and A β 1-42, a 42 residues peptide much more insoluble and more toxic than the A β 1-40. For A β determination, 6 cortex and 4 hippocampus of Tg groups were used. No wild-type animals were used because A β is not present in these animals. A total tissue amount of 10 mg from each sample was weighed and mechanically homogenized in a PBS buffer supplemented with AEBSF as a protein inhibitor. After this first homogenization, tissues were treated with a homogenization buffer (5 M guanidine, 50 mM Tris-HCl buffer). The homogenates were incubated for 4 h at room temperature and then centrifuged at 16.000 g for 20 min at 4°C to obtain the supernatants, where the concentrations of A β 40 and A β 42 were measured using Human A β 40 ELISA kit and Human A β 42 ELISA kit (both purchased from Invitrogen, Frederick, USA) according to the manufacturer's instructions. A β levels were expressed as nmol/g of tissue and pmol/mg of protein. Ratios A β 42/ A β 40 were also calculated. Each sample was analyzed in triplicate. A fraction of each homogenate was also used to determine the protein

content by a Quick start Bradford method using bovine serum albumin as standards (Bio Rad, Barcelona, Spain).

Casp-3 and SOD2 Western Blot analysis

Samples of cortex and hippocampus of wild-type and 2576Tg mice were placed in sample buffer (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v), 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue), and denatured by boiling at 95–100 °C for 5 min. Samples were then separated by electrophoresis on 12% acrylamide gels (BioRad, California, USA). Proteins were subsequently transferred to PVDF sheets (Trans-Blot® Turbo™ RTA Mini PVDF Transfer Kit, BioRad, CA, USA) using a transblot apparatus (BioRad). The membranes were blocked for 1 h with 5% non-fat milk dissolved in TBS-T buffer (50 mM Tris, 1.5% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5). They were incubated overnight with primary monoclonal antibodies against SOD2 and cleaved Casp-3 (Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA). The blots were washed thoroughly in TBS-T buffer and incubated for 1 h with an anti-rabbit or anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signalling Technology). Immunoreactive proteins were visualized using an Immun-Star Chemiluminescence kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Digital images were taken with a Versadoc (BioRad), which permits semi-quantification of the band intensity. The protein load was periodically monitored via the immuno-detection of β -actin by monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics 23.0). To evaluate the homogeneity of variances, the Levene test was used. When the variances were homogeneous, an ANOVA test (genotype x treatment) was carried out. Subsequently, Tukey and Scheffé paired comparisons (as post hoc tests) were applied 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. Results are given as mean values \pm standard deviations (SD). For all tests, the level of statistical significance was established at $p < 0.05$.

Results

A β protein determination

Concentrations of A β in cortex and hippocampus are shown in Table 1. Ratio A β 42/A β 40 was calculated for each measurement, being means compared. Only Tg mice were used due to the fact that A β is not present in wild-type mice. In all samples tested, the quantity of A β 1-40 was higher than that of A β 1-42 in both tissues. An interaction (tissue x treatment) was found in

A β 1-40 [F(1,49)=113.280, p<0.005] and in A β 1-42 [F(1,49)=256.810, p<0.005]. A general effect of tissue on the quantity of A β 42 [F(1,49)= 14.560, p<0.005] was also observed.

We also assessed the differences between treatments separately from cortex and hippocampus. ANOVA tests were applied in both cases. No significant differences between groups of treatment were found, but a relationship between A β and Mel was noted in both cortex and hippocampus. As noted in Figure 1, although the effect is not statistically significant, all the treatment groups tested increased the quantity of A β excepting the Mel treatments when compared with control group (A β 1-40 and A β 1-42 in cortex and A β 1-40 in hippocampus). Also, the quantity of A β 1-40 and A β 1-42 (in cortex and hippocampus) of ALCitMel group was reduced in comparison with ALCit group but the effect remained not statistically significant.

Casp-3 and SOD2 protein analysis

Results of Western Blot analyses are presented in Table 2. Ratios of Casp-3 and SOD2 were obtained and standardized using β -actin as a reference. Means of Casp-3/Actin and SOD2/Actin for each measurement, and with the standardized values, were obtained. The results for cortex and hippocampus in wild-type and Tg mice were analyzed. Interactions (genotype x treatment) were found in both tissues and for both Casp-3 and SOD2, being in cortex [F(2,29)=567.418, p < 0.005] for Casp-3, and [F(2,29)=371.156, p < 0.005] for SOD2 and in hippocampus [F(2,29)=1384.513, p < 0.005] for Casp-3 and [F(2,29)=373.762, p < 0.005] for SOD2. An effect of genotype was also found in Casp-3 in hippocampus showing lower values of Casp-3 in Tg groups compared with wild-type groups [F(2,29)=4.973, p=0.034] (Figure 2). However, no significant differences according to treatments were found.

Something similar occurred in cortex (Figure 3). All wild-type groups showed more Casp-3 and SOD2 than the Tg group although the effect was not statistically significant. The values of Casp-3 and SOD2 decreased in both genotypes, when ALCitMel treatment was compared with ALCit group but the effect remained not statistically significant. Moreover, and rather surprisingly, we found elevated (but not statistically significant) ratios of both Casp-3 and SOD2 in Cit and Mel groups, both in cortex and hippocampus of wild-type and Tg mice.

Discussion

The mouse model used in this study, Tg2576, is genetically programmed to express and progressively to accumulate A β . Animals were given Al, whose exposure is well established that increases A β formation and promotes its aggregation. Based on this, in the current study we expected to find a higher accumulation of A β in the Al-treated groups than in the Mel-treated ones [9, 21-23, 34, 63]. However, only a tendency appeared in A β 1-40 and A β 1-42 in the analyzed tissues. The results of this study indicate that Mel decreases the expression or the accumulation of A β 1-40 and A β 1-42. It is important to remark how the means of A β 1-40 values

in cortex and hippocampus, and A β 1-42 in cortex of AICitMel group, showed similar or lower values of A β than their respective control groups (although AICit groups showed the largest means from all the treatment here tested). We think that it could be a first step to find significant differences, demonstrating that the co-administration of Mel during Al treatment could reduce A β accumulation in cortex and hippocampus.

With respect to the conditions of the experiment, we should note the long period of treatment (14 months) and how elderly were mice at the moment of being assessed. Cummings et al. [66], using also a transgenic mouse model of A β expression, reported an increase from 7 to 25 fold of A β 1-40 and A β 1-42 concentrations, respectively (in only 4 month). On the other hand, Wang et al. [67], using the same mouse model, reported concentrations of 7 ng A β 1-40 and 1.5 ng A β 1-42 per mg of tissue, in cortex and hippocampus, respectively. In the current investigation, we have found values of 50 ng A β 1-40 and 20 ng A β 1-42 per mg of tissue in cortex, and 13 ng A β 1-40 and 7 ng A β 1-42 per mg of tissue in hippocampus. Based on this and considering that Tg2576 mice show A β plaques from 9 month of age [63, 68, 69], the long duration of the study, as well as the high concentrations of A β , could be masking a period where the amount of A β at the different groups of treatment would have shown significant differences.

Unexpectedly, experimental groups treated with Cit showed higher accumulation of A β in cortex and hippocampus when compared with the C-Tg group (only Tg groups were tested for A β). In relation to it, in a previous study we showed that the Cit-Tg group accumulated in brain high concentrations of Mn and Fe from chow [12]. It has been also reported that nanomolar concentrations of transition metal ions are enough to turn the A β from the non amyloidogenic pathway to the amyloidogenic one, which facilitates its aggregation [37, 70]. Taking together all these findings, the fact that we used the Cit to increase the absorption of Al, the increases found in A β , could respond to an increase of Fe and Mn absorption, instead of being a direct effect of Cit [61, 71-75].

In this study, the pro-apoptotic and anti-apoptotic balance, which decides the cell survival, was evaluated through the measurement of protein levels of two specific markers, the Casp-3, considered the main effector of apoptosis [27, 57, 64], and the SOD2, a key protein in the functioning and survival of neurons [35, 40]. A number of investigations have tried to relate A β with oxidative damage and apoptosis. There are studies where A β 42 has shown to be related with the expression of Casp-3, and consequently, with neuronal death in cortex and hippocampus using others AD mouse models [40, 64].

Combined mouse models were also developed to study the effect of SOD2 at A β levels. A SOD2 knockout mouse model, crossed with a Tg19959 mouse model, showed increased A β plaques formation. On the other hand, the mouse model Tg2576 with over-expressing the SOD2 gene showed reduced A β plaques formation [6, 40, 65]. The tendencies in A β , Casp-3 and SOD2 protein levels shown the same pattern. In all cases, the values found in AICitMel group were lower than those in AICit group, supporting a decrease of damage related to Mel, which is in agree with the results of previous investigations [39, 76].

In the present study, wild-type groups showed more Casp-3 and SOD2 protein levels than Tg groups in both tissues studied. Probably, wild-type mice reacted more efficiently against apoptotic damage, potentiating the SOD2 expression in healthy neurons as a compensatory method. On the other hand, we have found two unexpected results: the high protein levels of Casp-3 and SOD2 in cortex and hippocampus of Cit and Mel groups. As above mentioned, this high protein levels seem to respond to the increase of heavy metal (Fe, Mn and Zn) levels found [12]. Fe has been related with an increase of oxidative damage, while harmful properties of Mn could produce a parkinsonism-like syndrome, which had been already reported [77, 78]. In addition, although the antioxidant effect of Mel has been widely demonstrated, this surprising pro-oxidant effect was already previously reported. Bondy et al. [79] described a dose-dependent pro-oxidant effect in mice exposed to Mel during 6 months (from 3 to 9 months of age). While a number of properties are known from Mel, it is unlikely to be a simple antioxidant. Further investigations are necessary to clarify this contradictory effect of Mel. To date, attempts to stop the progression of the symptoms of AD with antioxidants have not been as successful as investigators could expect. A considerable number of investigations have conducted aimed at understanding the causes of AD, the mechanisms underlying A β toxicity, pro- and anti-oxidants balance, ROS production, etc., and finally to find an appropriate substance which can able to stop and hopefully reverse those damages.

Conflict of interest

The authors declare that there is not any conflict of interest related with this investigation.

Acknowledgement

Financial support for this study was provided by “Fondo de Investigación Sanitaria”, Ministry of Health, Spain, through grant No. PI080065.

References

- [1] 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(5):1101-1108.
- [2] Guo W, Sha S, Xing X, Jiang T, Cao Y. 2013. Reduction of cerebral A β burden and improvement in cognitive function in Tg-APP^{sw}/PSEN1^{dE9} mice following vaccination with a multivalent A β 3-10 DNA vaccine. *Neurosci Lett.* 9;549:109-115.

- [3] Wang Z, Wei X, Yang J, Suo J, Chen J, Liu X, Zhao X. 2016. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci Lett.* Jan 1; 610:200-206.
- [4] Shukla M, Boontem P, Reiter RJ, Satayavivad J, Govitrapong P. 2017. Mechanisms of Melatonin in Alleviating Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 13. doi: 10.2174/1570159X15666170313123454.
- [5] Wang P., Wang ZY. 2017. Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 35:265-290.
- [6] Massaad CA, Washington TM, Pautler RG, Klann E. 2009. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11; 106(32):13576-135781.
- [7] Mold M, Ouro-Gnao L, Wieckowski BM, Exley C. 2013. Copper prevents amyloid- β (1-42) from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro. *Sci Rep.* 3:1256. doi: 10.1038/srep01256.
- [8] Selvaraju Subash, Musthafa Mohamed Essa, Abdullah Al-Asmi, Samir Al-Adawi, Ragini Vaishnav, Nady Braidy, Thamilarasan Manivasagam, and Gilles J. Guillemin. 2014. Pomegranate from Oman Alleviates the Brain Oxidative Damage in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's disease. *J Tradit Complement Med.* 4(4): 232–238.
- [9] Walton, J.R., 2012a. Cognitive deterioration and associated pathology induced by chronic low-level aluminum ingestion in a translational rat model provides an explanation of Alzheimer's disease, tests for susceptibility and avenues for treatment. *Int J Alzheimers Dis* 2012:914947. doi:10.1155/2012/914947.
- [10] Walton, J.R., 2013. Aluminum's involvement in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 35(1):7-43.
- [11] Yokel, R.A., 2013. Aluminum. In: *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. (Ed: Caballero B) Elsevier. pp. 57-63.
- [12] Di Paolo C, Cabré M, Domingo JL, Gómez M. 2014. Melatonin does not modify the concentration of different metals in A β PP transgenic mice. *Food Chem Toxicol.* 70:252-259.

- [13] Rusina R, Matěj R, Kašparová L, Kukul J, Urban P. 2011. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data transformation. *Neurotox Res.* 20(4):329-333.
- [14] Exley C. and Vickers T. 2014. Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium: a case report. *J. Med. Case Rep.* 8: 41-48.
- [15] Domingo, J.L., Gómez, M., Sánchez, D.J., Llobet, J.M., Corbella, J., 1993. Effect of various dietary constituents on gastrointestinal absorption of aluminum from drinking water and diet. *Res. Commun Chem Pathol Pharmacol* 79: 377-380.
- [16] Whitehead, M.W., Farrar, G., Christie, G.L., Blair, J.A., Thompson, R.P., Powell, J.J., 1997. Mechanisms of aluminum absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 65: 1446–1452.
- [17] Zhou, Y., Harris, W.R., Yokel, R.A., 2008. The influence of citrate, maltolate and fluoride on the gastrointestinal absorption of aluminum at a drinking water-relevant concentration: A ²⁶Al and ¹⁴C study. *J Inorg Biochem* 102:798-808.
- [18] García, T., Ribes, D., Colomina, M.T., Cabré, M., Domingo, J.L., Gómez, M., 2009. Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease. *Toxicology* 265:49-55.
- [19] Walton, J.R., 2012b. Evidence that ingested aluminum additives contained in processed foods and alum-treated drinking water are a major risk factor for Alzheimer's disease. *Curr Inorg Chem* 2: 19-39.
- [20] Exley C. 2016. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie.* 100(329):51-55.
- [21] Kawahara, M., Kato, M., Kuroda, Y., 2001. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein, *Brain Res Bull* 55: 211-217.
- [22] Rodella, L.F., Ricci, F., Borsani. E., 2008. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol Histopathol* 23: 433-439.

- [23] Wang Z., Wei X., Yang J., Suo J., Chen J., Liu X., Zhao X. 2017. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci Lett.* 1; 610: 200-206.
- [24] Stumm C, Hiebel C, Hanstein R, Purrio M, Nagel H, Conrad A, Lutz B, Behl C, Clement AB. 2013. Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition. *Neurobiol Aging.* Nov;34(11): 2574-2584.
- [25] Liu, X.J., Yuan, L., Yang, D., Han, W.N., Li, Q.S., Yang, W., Liu, Q.S., Qi, J.S., 2013. Melatonin protects against amyloid- β -induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats. *Synapse* 67: 626-636.
- [26] Fan LF, Xu DE, Wang WH, Yan K, Wu H, Yao XQ, Xu RX, Liu CF, Ma QH. 2013. Caspr interaction with Amyloid Precursor Protein reduces amyloid- β generation in vitro. *Neurosci Lett.* 26; 548: 255-260.
- [27] Ghribi O, Herman MM, Savory J. 2002. The endoplasmic reticulum is the main site for caspase-3 activation following aluminum-induced neurotoxicity in rabbit hippocampus. *Neurosci Lett.* 2002 May 24; 324(3):217-221.
- [28] He H, Dong W, Huang F. 2010. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease. *Curr Neuropharmacol.* 2010 8(3): 211-217.
- [29] Tay WM, Huang D, Rosenberry TL, Paravastu AK. 2013. The Alzheimer's amyloid- β (1-42) peptide forms off-pathway oligomers and fibrils that are distinguished structurally by intermolecular organization. *J Mol Biol.* 24; 425(14): 2494-508.
- [30] O'Neal-Moffitt G, Delic V, Bradshaw PC, Olcese J. 2015. Prophylactic melatonin significantly reduces Alzheimer's neuropathology and associated cognitive deficits independent of antioxidant pathways in A β PP (swe)/PS1 mice. *Mol Neurodegener.* 11: 10-27.
- [31] Mukda S, Panmanee J, Boontem P, Govitrapong P. 2016. Melatonin administration reverses the alteration of amyloid precursor protein-cleaving secretases expression in aged mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 16; 621: 39-46.
- [32] Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T. 2011. SOD1 (copper/zinc

- superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30; 286(52): 44557-44568.
- [33] Ma T, Hoeffler CA, Wong H, Massaad CA, Zhou P, Iadecola C, Murphy MP, Pautler RG, Klann E. 2011. Amyloid β -induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide. *J Neurosci.* 13; 31(15): 5589-5595.
- [34] Flynn JM and Melov S. 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*; 62: 4-12
- [35] Yan MH, Wang X, Zhu X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med*; 62: 90-101.
- [36] Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. 2015. Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Application in Neurodegenerative Disorders. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(2):163-169.
- [37] Walton JR. 2014. Chronic aluminum intake causes Alzheimer's disease: applying Sir Austin Bradford Hill's causality criteria. *J Alzheimers Dis.* 40(4): 765-838.
- [38] Allagui MS, Hachani R, Saidi S, Feriani A, Murat JC, Kacem K, El feki A. 2015. Pleiotropic protective roles of melatonin against aluminium-induced toxicity in rats. *Gen Physiol Biophys.* 34(4): 415-424.
- [39] Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Abdel Moneim AE. 2015. The protective properties of melatonin against aluminium-induced neuronal injury. *Int J Exp Pathol.* 96(3): 196-202.
- [40] Dasuri K, Zhang L, Keller JN. 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med.* 62: 170-185.
- [41] Bubenik, G.A., Konturek, S.J., 2011. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol* 62: 13-19.
- [42] Baño Otalora, B., Popovic, N., Gambini, J., Popovic, M., Viña, J., Bonet-Costa, V., Reiter, R.J., Camello, P.J., Rol, M.Á., Madrid, J.A., 2012. Circadian system functionality, hippocampal oxidative stress, and spatial memory in the

- APPswe/PS1dE9 transgenic model of Alzheimer disease: effects of melatonin or ramelteon. *Chronobiol Int* 29: 822-834.
- [43] Antunes Wilhelm, E., Ricardo Jesse, C., Folharini Bortolatto, C., Wayne Nogueira, C., 2013. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: protective effect of melatonin. *Eur J Pharmacol* 701: 65-72.
- [44] Reiter, R.J., 1995. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol* 30, 199-212.
- [45] García, T., Esparza, J.L., Nogués, M.R., Romeu, M., Domingo, J.L., Gómez, M., 2010. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. *Hippocampus* 20, 218-225.
- [46] Reiter, R.J., Tan, D.X., Fuentes-Broto, L., 2010. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res* 181: 127-151.
- [47] Corrales, A., Martínez, P., García, S., Vidal, V., García, E., Flórez, J., Sanchez-Barceló, E.J., Martínez-Cué, C., Rueda, N., 2013. Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *J Pineal Res* 54: 346-358.
- [48] Mauriz, J.L., Collado, P.S., Veneroso, C., Reiter, R.J., González-Gallego, J., 2013. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 54: 1-14.
- [49] Rudnitskaya EA, Muraleva NA, Maksimova KY, Kiseleva E, Kolosova NG, Stefanova NA. 2015. Melatonin Attenuates Memory Impairment, Amyloid- β Accumulation, and Neurodegeneration in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 47(1): 103-116.
- [50] Kandimalla R., Vallamkondu J., Corgiat EB., Gill KD. 2016. Understanding Aspects of Aluminum Exposure in Alzheimer's Disease Development. *Brain Pathol*. 26(2): 139-154.
- [51] Prakash A, Dhaliwal GK, Kumar P, Majeed AB. 2017. Brain biometals and Alzheimer's disease - boon or bane? *Biometals*. 29(3): 399-409.

- [52] Behl C. 2000. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 107(11):1325-44.
- [53] Vila M, Przedborski S. 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 4(5): 365-375.
- [54] Ding, H., Wang, H., Zhao, Y., Sun, D., Zhai, X., 2015. Protective effects of baicalin on alpha-induced learning and memory deficit, oxidative stress, and apoptosis in rat. *Cell. Mol. Neurobiol.* Jul; 35(5):623-632.
- [55] D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. 2012. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci.* 35(11): 700-709.
- [56] Snigdha S, de Rivera C, Milgram NW, Cotman CW. 2014. Exercise enhances memory consolidation in the aging brain. *Front Aging Neurosci.* 3; 6:3. 1-14: doi: 10.3389/fnagi.2014.00003.
- [57] Juraver-Geslin HA and Durand BC. 2015. Early development of the neural plate: new roles for apoptosis and for one of its main effectors caspase-3. *Genesis.* 53(2):203-224.
- [58] Ramos E, Egea J, de Los Ríos C, Marco-Contelles J, Romero A. 2017. Melatonin as a versatile molecule to design novel multi target hybrids against neurodegeneration. *Future Med Chem.* 9(8): 765-780.
- [59] Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14(12): 1677-1679.
- [60] Quinn J, Kulhanek D, Nowlin J, Jones R, Praticò D, Rokach J, Stackman R. 2005. Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg2576 mice: implications for clinical trials. *Brain Res.* 2005 Mar 10;1037(1-2):209-213.
- [61] Gómez, M., Esparza, J.L., Cabré, M., García, T., Domingo, J.L., 2008. Aluminum exposure through the diet: metal levels in AbetaPP transgenic mice a model for Alzheimer's disease. *Toxicology* 249: 214-219.
- [62] Golub, M.S., Keen, C.L., 1999. Effects of dietary aluminum on pubertal mice. *Neurotoxicol Teratol* 21: 595-602.

- [63] 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.
- [64] Masumura M, Hata R, Nishimura I, Uetsuki T, Sawada T, Yoshikawa K. 2000. Caspase-3 activation and inflammatory responses in rat hippocampus inoculated with a recombinant adenovirus expressing the Alzheimer amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res.* 15; 80(2):219-227.
- [65] Li F, Calingasan NY, Yu F, Mauck WM, Toidze M, Almeida CG, Takahashi RH, Carlson GA, Flint Beal M, Lin MT, Gouras GK. 2004. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J Neurochem.* 89(5):1308-1312.
- [66] Cummings DM, Liu W, Portelius E, Bayram S, Yasvoina M, Ho SH, Smits H, Ali SS, Steinberg R, Pegasiou CM, James OT, Matarin M, Richardson JC, Zetterberg H, Blennow K, Hardy JA, Salih DA, Edwards FA. 2015. First effects of rising amyloid- β in transgenic mouse brain: synaptic transmission and gene expression. *Brain.* 138: 1992-2004.
- [67] Wang J, Ho L, Chen L, Zhao Z, Zhao W, Qian X, Humala N, Seror I, Bartholomew S, Rosendorff C, Pasinetti GM. Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2007 Nov; 117(11): 3393-3402.
- [68] Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., Cole, G., 1996. Correlative memory deficits Abeta elevation and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274: 99–102.
- [69] Westerman, M.A., Cooper-Blacketer, D., Mariash, A., Kotilinek, L., Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Carlson, G.A., Younkin, S.G., Ashe, K.H., 2002. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 22: 1858–1867.
- [70] Kamalinia G, Khodaghali F, Atyabi F, Amini M, Shaerzadeh F, Sharifzadeh M, Dinarvand R. 2013. Enhanced brain delivery of deferasirox-lactoferrin conjugates for iron chelation therapy in neurodegenerative disorders: in vitro and in vivo studies. *Mol Pharm.* 2013 Dec 2; 10(12):4418-4431.

- [71] Maynard, C.J., Cappai, 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.
- [72] Bush, A.I., 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 26:207–214.
- [73] Kawahara, M., 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 8: 171–182.
- [74] Domingo JL. 2006. Aluminum and others metals in Alzheimer's disease: A review of potential therapy with chelating agents. *J Alzheimers Dis.* 10:331-342.
- [75] Shcherbatykh I, Carpenter DO. 2007. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 23: 191-205.
- [76] Prakash D, Sudhandiran G. 2015. Dietary flavonoid fisetin regulates aluminium chloride-induced neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of mice brain. *J Nutr Biochem.* 26(12):1527-1539.
- [77] Yokel, Robert A. 2006. Blood-brain barrier flux of aluminum, manganese, iron and other metals suspected to contribute to metal-induced neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis.* vol. 10, no. 2-3, pp. 223-253.
- [78] Wang P, Wu Q, Wu W, Li H, Guo Y, Yu P, Gao G, Shi Z, Zhao B, Chang YZ. 2017. Mitochondrial Ferritin Deletion Exacerbates β -Amyloid-Induced Neurotoxicity in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:1020357. 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/1020357>.
- [79] Bondy SC, Yang YE, Walsh TJ, Gie YW, Lahiri DK. 2002. Dietary modulation of age-related changes in cerebral pro-oxidant status. *Neurochem Int.* Feb; 40(2):123-130.

Table 1. A β levels in cortex and hippocampus of Tg mice.

CORTEX	[A β] nmol /g tissue		[A β]pmol/mg protein		Ratio	
	A β 40	A β 42	A β 40	A β 42	A β 42/A β 40	
Control	53,06 \pm 26,10	20,3 \pm 6,61	302,15 \pm 201,81	102,93 \pm 30,29	0,44 \pm 0,22	
Cit	93,46 \pm 28,68	27,7 \pm 5,75	463,54 \pm 209,98	130,97 \pm 40,07	0,31 \pm 0,11	
Mel	51,52 \pm 20,95	22,2 \pm 5,56	259,82 \pm 200,24	96,58 \pm 18,86	0,46 \pm 0,14	
AICit	75,93 \pm 32,78	24,7 \pm 4,01	386,76 \pm 241,76	116,89 \pm 32,48	0,36 \pm 0,14	
AICitMel	64,58 \pm 30,79	23,4 \pm 5,78	330,12 \pm 203,83	110,35 \pm 32,46	0,41 \pm 0,16	

HIPPOCAMPUS	[A β] nmol /g tissue		[A β]pmol/mg protein		Ratio	
	A β 40	A β 42	A β 40	A β 42	A β 42/A β 40	
Control	13,53 \pm 3,26	7,08 \pm 2,28	59,85 \pm 9,63	29,78 \pm 6,13	0,5 \pm 0,05	
Cit	74,27 \pm 56,29	15,44 \pm 4,64	303,2 \pm 236,87	60,25 \pm 19,17	0,27 \pm 0,15	
Mel	51,63 \pm 37,18	16,84 \pm 9,90	212,69 \pm 100,78	68,83 \pm 19,71	0,35 \pm 0,10	
AICit	92,56 \pm 54,23	31,47 \pm 13,22	403,79 \pm 225,30	129,47 \pm 51,14	0,36 \pm 0,11	
AICitMel	29,67 \pm 8,10	12,28 \pm 5,74	157,29 \pm 78,08	60,97 \pm 34,79	0,39 \pm 0,16	

Results are expressed as means \pm standard deviation (N=5)

Table 2. Casp-3 and SOD2 ratio in cortex and hippocampus of wild-type and Tg mice.

TISSUE	Treatment	Ratio Casp-3/Act		Ratio SOD2/Act	
		W	Tg	W	Tg
CORTEX	Control	1,35 ± 0,49	1,70 ± 0,83	1,41 ± 0,15	1,64 ± 0,19
	Cit	1,94 ± 1,39	1,68 ± 0,75	1,97 ± 1,09	1,76 ± 0,63
	Mel	1,88 ± 0,75	1,97 ± 1,28	1,85 ± 0,35	1,75 ± 0,58
	AICit	1,89 ± 1,29	2,06 ± 1,69	1,75 ± 0,62	1,77 ± 0,90
	AICitMel	1,80 ± 1,07	1,75 ± 0,92	1,68 ± 0,54	1,73 ± 0,43
HIPPOCAMPUS	Control	1,26 ± 0,04	1,19 ± 0,23	1,27 ± 0,37	1,14 ± 0,33
	Cit	1,35 ± 0,25	1,22 ± 0,08	1,30 ± 0,26	1,15 ± 0,06
	Mel	1,41 ± 0,01	1,27 ± 0,13	1,30 ± 0,28	1,13 ± 0,23
	AICit	1,39 ± 0,05	1,33 ± 0,17	1,18 ± 0,14	1,16 ± 0,19
	AICitMel	1,26 ± 0,14	1,29 ± 0,22	1,15 ± 0,25	1,17 ± 0,40

Results are expressed as means ± standard deviation.

W= wild-type animals; Tg= 2576 Tg animals (N=5)

Figure 1. Effect of treatment on concentration of A β 40 and 42 in Tg animals.

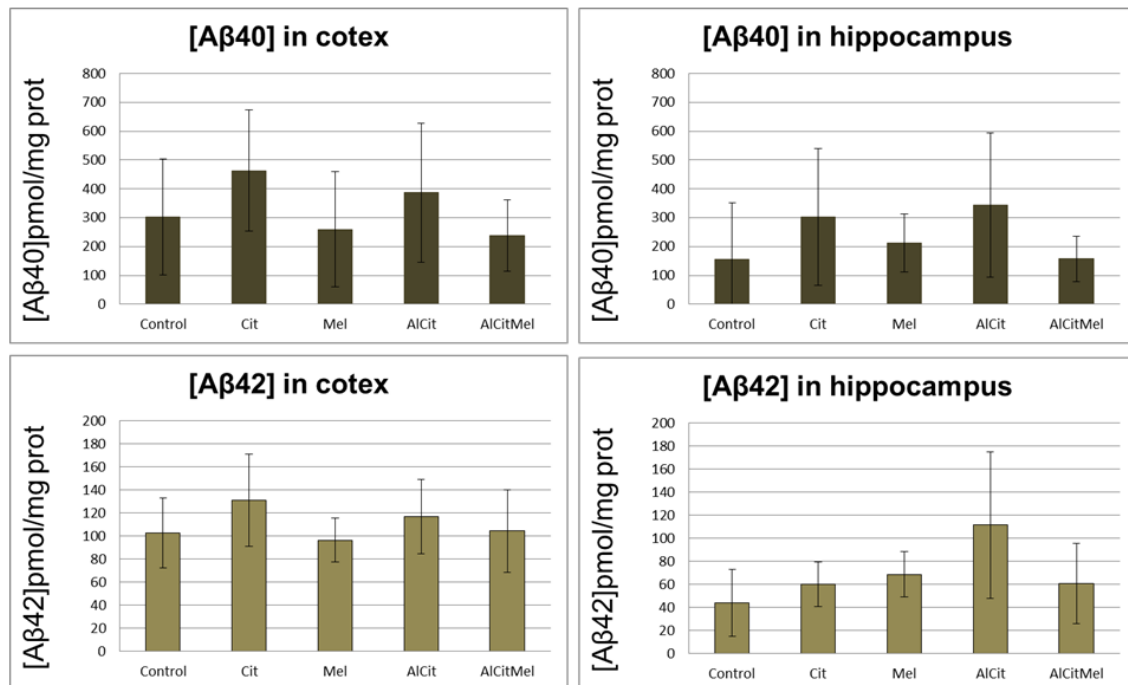
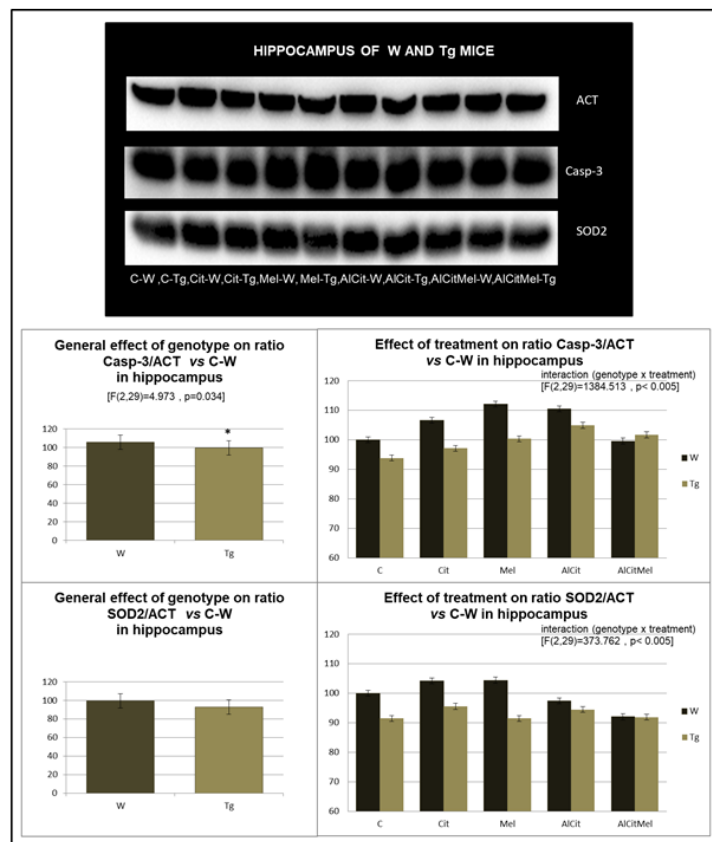
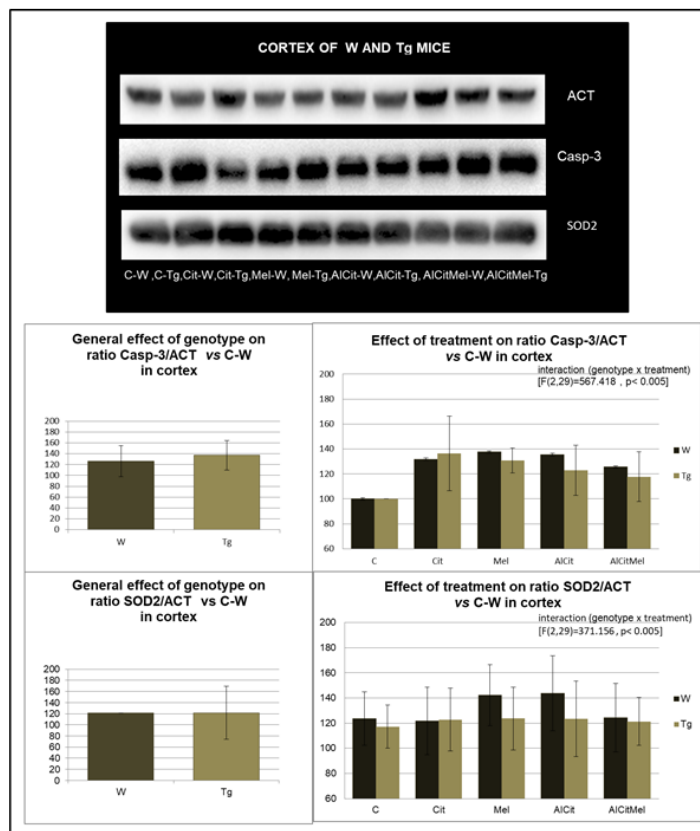


Figure 2. Effect of treatment on ratios of Casp-3 and SOD2.



W= wild-type animals; Tg= 2576 Tg animals

Figure 3. Effect of treatment on ratios of Casp-3 and SOD2.



W= wild-type animals; Tg= 2576 Tg animals

6. DISCUSIÓN

6.1 Efectos neuroconductuales de la exposición crónica a Al y melatonina.

La Enfermedad de Alzheimer es una de las mayores causas de deterioro que afecta a las personas de edad avanzada en la sociedad moderna. Causas genéticas y ambientales contribuyen al inicio y a la progresión de la enfermedad. Las neurotoxinas como el Al han sido propuestas como factores de riesgo ambientales para desarrollar la AD. El aumento del número de aplicaciones comerciales e industriales del Al ha multiplicado los estudios de este elemento, mientras su vinculación con la AD y otras enfermedades neuropatológicas ha ganado soporte (Yokel, 2000; Praticò et al., 2002; Gómez et al., 2008; Rodella et al., 2008; Walton, 2013; Exley y Vickers, 2014; Cao et al., 2017; King et al., 2017; Mirza et al., 2017).

El genotipo influyó tanto en la actividad en el OF como en el aprendizaje en el MWM. En el OF, los ratones Tg mostraron una actividad general mayor, que ya ha sido descrita anteriormente (King et al., 1999; Lalonde et al., 2003; Ribes et al., 2008; García et al., 2009; Selvaraju et al., 2016). En el presente estudio los ratones Tg mostraron también un aumento en la frecuencia de entradas al centro del OF sugiriendo una menor ansiedad en estos animales. En relación a esto, Lalonde et al. (2003) observó una mayor exploración de los brazos abiertos en el Plus-maze.

En el presente estudio, los ratones Tg no estuvieron más tiempo en el centro del OF y por ello, el aumento de las entradas al centro refleja una mayor actividad general (Lorenzini et al., 2016). Rodgers et al. (2012) describió que la sobreexpresión de APP puede interferir en el proceso de desarrollo en los ratones Tg induciéndoles hiperactividad de larga duración.

En el MWM, los ratones Tg mostraron una peor adquisición que los wild-type. La relación entre acumulación de A β y deterioro cognitivo ha sido bien establecida. Déficits en el aprendizaje y la memoria han sido descritos en ratas después de la administración intraventricular de fragmentos de A β en el hipocampo (Liu et al., 2013) y también en los ratones Tg que muestran placas amiloideas (Hsiao et al., 1996; Westerman et al., 2002; Ribes et al., 2008). A pesar de ello, existe cierta controversia en relación a la edad del inicio de los déficits en los ratones Tg así como en la capacidad de diferenciar entre los déficits inducidos por la A β y los propios de la edad avanzada. Por otro lado, hay investigadores que han descrito los déficits solo en hembras Tg (King et al., 1999) y otros que no han encontrado ningún efecto del genotipo (Bizon et al., 2007). Estos resultados discrepantes pueden deberse a diferencias en el protocolo del MWM. Bizon et al. (2007) utilizó un protocolo en el que se intercalaban sesiones con la plataforma visible y otras con la plataforma

sumergida. Estos autores observaron que tanto los ratones wild-type como los Tg estaban utilizando estrategias no espaciales para encontrar la plataforma. Prevenir el uso de estrategias egocéntricas, disminuir el número de intentos al día y controlar las pistas interiores del MWM debería incrementar la sensibilidad de los tests espaciales para detectar mejor los déficits funcionales en estadios iniciales de neurodegeneración (Ribes et al., 2008; García et al., 2009). En este estudio, se añadió una pared interior al MWM y se rotó entre los ensayos para controlar las pistas interiores, esto responde a la necesidad de una tarea de aprendizaje y memoria con demandas mayores.

Se ha demostrado que los ácidos dicarboxílicos, incluyendo el Cit, aumentan la absorción del Al mediante la modificación de las condiciones de pH y favoreciendo la formación de sales de Al con una solubilidad superior (García et al., 2009; Walton, 2012b; Wu et al., 2012; Silva et al., 2013).

Inesperadamente, se ha notado un efecto del Cit en la actividad vertical de los ratones Tg. Los animales del grupo Cit-Tg mostraron un aumento en los *rearing* en comparación con los animales de los grupos Mel-Tg y AICit-Tg.

Otra interacción se observó en el MWM entre el Cit y el genotipo Tg, mostrando resultados similares en los grupos Cit-Tg y AICit-Tg. Una posible explicación es que el Cit puede haber aumentado la absorción de Al (y otros metales) presentes en la dieta y el agua de bebida (Golub y Keen, 1999; Zhou et al., 2008; Walton, 2012a; Walton, 2013; Yokel, 2013; Wang et al., 2016). El aumento en la absorción de estos metales puede haber sido el causante de las alteraciones observadas en el comportamiento. A pesar de ello, el efecto es sutil y requiere más investigación.

No se observaron efectos en la actividad general debidos al tratamiento con AICit. De acuerdo con estos resultados, exposiciones prolongadas a Al durante el desarrollo (Roig et al., 2006) o en adultos (Colomina et al., 2002; Ribes et al., 2008; García et al., 2009) no afectaron a los niveles de actividad en roedores.

A pesar de no encontrar efecto general del AICit en el MWM, los animales del grupo AICit-Tg mostraron la peor adquisición de la tarea de entre todos los grupos. En concordancia, en estudios previos de nuestro laboratorio ya se había observado una ejecución pobre en el MWM en ratones Tg de 11 meses de edad después de una exposición prolongada a Al (García et al., 2009; Ribes et al., 2010). Silva et al. (2013) incluso encontró déficits de aprendizaje en el T-maze después del tratamiento con AICit en ratas. Además, altas dosis de Al durante el desarrollo también dañaron el aprendizaje de ratones adultos (Golub y Germann, 2001). En contraste, el tratamiento con Al dañó el aprendizaje de los ratones wild-type de 9 meses de edad y no a los Tg (Ribes et al., 2008).

En el presente estudio, los ratones del grupo AICit-Tg no mostraron retención a largo plazo. Déficits en la retención a largo plazo han sido descritos en ratas expuestas a AICit (Silva et al., 2013). Ribes et al. (2008) después de la administración de dosis bajas de Al encontró que ni los ratones wild-type ni los Tg eran capaces de recordar la localización de la plataforma. Déficits en la retención después del tratamiento con Al han sido también descritos por otros autores (Miu et al., 2003; Jing et al., 2004).

La melatonina, aumentó la actividad horizontal de los ratones Tg respecto al control Tg, mientras que los ratones wild-type tratados con Mel mostraron niveles de actividad más bajos que sus respectivos controles. Otros estudios en modelos Tg similares no encontraron efecto de la Mel en la actividad (García et al., 2009; Olcese et al., 2009; Corrales et al., 2013). La edad de los animales o la duración del tratamiento podrían explicar la discrepancia de resultados. Los tratamientos de estos estudios tenían una duración de entre 4 y 6 meses, mientras que la duración de nuestro estudio fue mucho mayor (14 meses).

La Mel aumentó el tiempo que los animales estuvieron en el centro del OF tanto en los ratones wild-type como en los Tg. El efecto ansiolítico de la Mel se ha descrito también en estudios previos en roedores (Pandi-Perumal et al., 2006; García et al., 2009; Olcese et al., 2009; Corrales et al., 2013).

El tratamiento con Mel mejoró el aprendizaje en los ratones Tg expuestos a AICit. Estudios recientes en ratones Tg indican que los antioxidantes como la Mel pueden reducir los déficits de memoria que dependen del hipocampo (García et al., 2009; McKenna et al., 2012; Silva et al., 2013; Selvaraju et al., 2016). A pesar de ello, es importante notar que en el presente estudio la Mel ha sido capaz de evitar o revertir el daño inducido por el tratamiento de AICit en los ratones Tg pero no ha mejorado la tarea de los ratones Tg del grupo control. De acuerdo con esto, en un estudio previo también se observó una retención mejor en ratones expuestos a Al y Mel en comparación con los animales tratados solo con Al (García et al., 2009). Esta mejora en la retención de los animales Tg tratados con AICit puede ser resultado del fuerte poder antioxidante de la Mel, de su habilidad para proteger contra el daño causado por radicales libres y de la potenciación que puede ejercer sobre varios antioxidantes (Reiter, 1995; García et al., 2009; Reiter et al., 2010; Corrales et al., 2013; Zhu et al., 2015; Yu et al., 2016; Zhai et al., 2017). Algunos estudios han demostrado ya los posibles efectos beneficiosos de la Mel en la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o la AD (Lack et al., 2001; Akbulut et al., 2008; Bubenik y Konturek, 2011; Baño et al., 2012; Antunes et al., 2013; Mendivil-Perez et al., 2017).

En resumen, el genotipo Tg aumenta la actividad en el OF, empeora la adquisición de la tarea del MWM pero no parece afectar a la retención de la

tarea. La actividad general no se vio afectada por el tratamiento con Cit ni por el de AlCit. El tratamiento con Mel aumenta la actividad general en los ratones Tg pero la disminuye en los wild-type. También se ha visto que la Mel ejerce un efecto ansiolítico en los dos genotipos. Además, en el MWM, el tratamiento con Mel mejora la retención de los ratones Tg expuestos a AlCit. También en el MWM, los ratones del grupo AlCit-Tg mostraron la peor adquisición de la tarea y no se observó retención de la tarea a largo plazo. Inesperadamente, los ratones del grupo Cit-Tg también mostraron una mala adquisición pero el efecto fue sutil y requiere por tanto más investigación.

6.2 Efecto de la melatonina en la concentración de Al y otros metales.

El Al es un conocido elemento neurotóxico envuelto en varias enfermedades neurodegenerativas con un componente de demencia. Se ha informado de la importancia de evitar la exposición de pacientes de AD a fuentes de Al como la comida procesada y algunas medicinas (Lione, 1985; Walton, 2012; Flynn y Melow, 2013; Miller et al., 2014; Al-Olayan et al., 2015; Wang et al., 2016; Mirza et al., 2017).

El Al del agua, la comida y los productos farmacéuticos contribuyen a una carga de Al biodisponible en el cuerpo. El comité de expertos de la FAO/WHO junto con la Comisión Europea establecieron una ingesta tolerable de Al de 1mg/ Kg de peso corporal/ semana. En el 74^o meeting de la JECFA (17-23 de Junio de 2011 en Roma) se estableció un PTWI de 2mg/ Kg de peso corporal (ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/JECFA_74_Summary_Report_4July2011-pdf) (Yokel, 2013).

Algunos compuestos de Al, como el maltolato, lactato o citrato se absorben mucho más fácilmente. Por tanto, son realmente más tóxicos que otros compuestos, como el fosfato de Al, que tiene una solubilidad muy baja (Domingo et al., 1993; Zhou et al., 2008; Yokel, 2013; Wang et al., 2016).

Los alimentos presentes en el estómago neutralizan el pH gástrico. La digestión produce en el estómago ácido cítrico, ascórbico, láctico y maltolatos. El Al puede formar complejos con ellos y otros compuestos del estómago formando una gran variedad de especies de Al que tienen también gran variedad de grados de toxicidad (Domingo et al., 1993; Yokel and Florence, 2006; Walton, 2012; Walton, 2013).

El pH del lumen intestinal va de 7.4 a 8.5. La absorción de Al puede darse en cualquier parte del intestino grueso, incluyendo el colon, que está especializado

en absorber iones metálicos presentes en el agua (Whitehead et al., 1997; Walton, 2012; Walton, 2013).

En el presente estudio a la dieta estándar de los animales se añadió Cit, un componente habitual de la dieta humana, para aumentar la absorción de Al. Se sabe que el Cit aumenta entre 5 y 10 veces la absorción de Al tanto en humanos como en animales (Domingo et al., 1993; Drüeke et al., 1997; Golub y Keen, 1999; Walton, 2012; Yokel, 2013; Wang et al., 2016). La absorción de Al aumenta de forma lineal de 1 mg hasta 8 mg, presenta un máximo alrededor de 8 mg y baja progresivamente de 16 mg a 32 mg debido a la formación de un precipitado de hidróxido de Al y coloides en las dosis más altas. Por tanto, las pequeñas cantidades de Al, como las presentes en el agua, se absorben mejor que las grandes cantidades.

Los metales como Al, Fe, Cu y Zn han sido incluidos en los potenciales factores de riesgo para la etiología de la AD. A pesar de ello, los mecanismos por los que estos metales ejercerían hipotéticamente su efecto siguen sin estar aclarados (Kamalinia et al., 2013; Exley y Vickers, 2014; Wang et al., 2016; Comes et al., 2017; Koseoglu et al., 2017).

Los resultados del presente estudio muestran que no se detectó Al en los grupos control, Cit ni Mel en ninguno de los genotipos (excepto en el hipocampo de los animales del grupo C-W). Solo se detectaron cantidades de Al del orden de ng/g en los grupos tratados con Al. En relación a las diferentes secciones del cerebro, la concentración de Al fue mayor en el hipocampo, seguido del cerebelo y el córtex. Además, la administración de Mel no modificó la concentración de Al. Resultados similares se han observado recientemente en nuestro laboratorio en ratones hembra Tg expuestas a Al a través de la dieta durante 6 meses pero sin suplementación de Cit (Gómez et al., 2008). Previamente, también encontramos que la Mel no disminuía las concentraciones de Al en cerebelo ni en córtex de ratas tratadas parenteralmente con Al y Mel (Esparza et al., 2003). Solo en el hipocampo se observó una reducción significativa de la cantidad de Al en el grupo tratado con Mel. En otro estudio en ratones Tg, tratados con Al y Mel, se encontró un aumento de los niveles de Al en córtex y cerebelo en el grupo tratado con Al y Mel pero no se encontraron diferencias significativas en el hipocampo (García et al., 2010a; García et al., 2010b).

En el presente estudio, en términos generales, no se ha encontrado aumento en la concentración de Fe en ninguna de las secciones encefálicas de los grupos estudiados al comparar los animales wild-type con los Tg, mientras que sí se observó un aumento en el hipocampo del grupo AlCit-Tg. Elevados niveles de Fe en el cerebro se han sido potencialmente relacionados con desórdenes neurodegenerativos (Campbell et al., 2001; Wang et al., 2016).

Estudios recientes han mostrado que la Mel enlaza e inactiva el Fe endógeno suprimiendo la reacción de Fenton con la consecuente sobreproducción de ROS (Ferry et al. 2005; Polimeni et al., 2014). La administración de Mel tampoco redujo los niveles de Fe.

Varias enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la AD, se caracterizan por modificar la homeostasis del Cu. En la AD el Cu está redistribuido de forma anormal en las placas amiloideas, dejando los tejidos y las células con deficiencia de Cu (Roberts et al., 2012). En relación al Zn, es conocido que el cerebro tiene uno de los niveles de Zn más elevados, a pesar de ello cambios globales en la concentración de Zn no se han relacionado con el envejecimiento del cerebro. Se ha establecido que en la AD, se enriquece la cantidad de Zn presente en las placas amiloideas en comparación con el control de la misma edad. En consecuencia, el atrapamiento de Zn en las placas, potencialmente provocaría la deslocalización de Zn funcional del resto del cerebro (Duce y Bush, 2010; Roberts et al., 2012). En relación a esto, Koseoglu et al. (2017) observó niveles de metales de transición en pelo y en uñas de pacientes de AD.

En el presente estudio no se observaron cambios importantes en las concentraciones de Zn ni de Cu en las regiones del cerebro analizadas en ninguno de los grupos experimentales. En un estudio previo, (Esparza et al., 2003), ratas tratadas parenteralmente con Al y Mel tampoco mostraron cambios en la concentración de Zn observada en córtex, cerebelo ni hipocampo, si se observó una reducción en la concentración de Cu al comparar los grupos de Al y de Al y Mel con el grupo control. Gómez et al. (2008) observó que las concentraciones de Cu en el hipocampo eran inferiores en los ratones Tg que en los wild-type. Una reducción en los niveles de Cu en cerebro entero en ratones Tg de 18 meses de edad también ha sido observada por Maynard et al. (2006).

En relación a la concentración de Mn en el cerebro, se ha encontrado un aumento significativo en los animales Tg del grupo Cit en comparación con los animales wild-type que también han visto otros autores (González-Domínguez et al., 2014). Maynard et al. (2006) encontró un aumento en los niveles de Zn en cerebro completo de ratones Tg a los 18 meses de edad en comparación con ratones de 3 meses. Por otro lado, Koseoglu et al. (2017) no observó diferencias significativas en los niveles de Mn en pelo y en uñas de pacientes de AD.

Hay muy pocos datos disponibles en la literatura acerca de las concentraciones de Al, Cu, Zn, Fe, y Mn en hígado, bazo, riñón y hueso en ratones Tg tratados con Al. Gómez et al. (2008) observó que la exposición de ratones Tg a Al no

producía ningún cambio importante relacionado con el genotipo en animales tratados con Al mediante la dieta.

Los resultados del presente estudio muestran que el hueso es el tejido con mayor concentración de Al. En un estudio previo de nuestro laboratorio con ratones Tg de 11 meses de edad (Gómez et al., 2008) la concentración de Al estaba por debajo de los límites de detección. Esto puede ser debido a que en el presente estudio el Al se ha administrado acompañado de Cit para aumentar la absorción y la retención del Al y la duración del tratamiento ha sido mayor (14 meses). Además, debido a un error del suministrador de dieta, en el estudio previo, el contenido de Al en la comida suplementada fue de 370 µg de Al/g de dieta en lugar de 1 mg de Al/ g de dieta que fue lo solicitado (Gómez et al., 2008).

Se ha encontrado una correlación entre la concentración de Fe y de Al en hueso, riñón y bazo. Sugiere que el Al y el Fe compiten por un mecanismo común de absorción gastrointestinal; esto ya había sido sugerido por Walton (2012b). El estado del Fe afecta a la absorción de Al. Los iones ferrosos reducen la absorción de Al mientras que los iones férricos carecen de este efecto. En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio, con ratas tratadas parenteralmente con Al y Mel, no encontramos ningún cambio en las concentraciones de Zn, Mn, Al, Fe ni Cu al comparar el grupo de Al con el de Al y Mel (Esparza et al., 2003).

En resumen, los resultados del presente estudio muestran que la mayor concentración de Al se encontró en hueso en el los grupos wild-type y Tg tratados con AlCit y en el hipocampo si nos referimos a las regiones encefálicas. Por otro lado, la Mel no modificó los niveles de metales en córtex, cerebelo ni hipocampo ni en hígado, riñón, bazo y hueso. En consecuencia, el efecto beneficioso de la administración de Mel en las enfermedades neurodegenerativas no respondería a variaciones en las concentraciones de ciertos metales (Al, Cu, Zn, Fe, Mn) en el cerebro, otros mecanismos podrán estar involucrados.

6.3 Efecto de la melatonina en la deposición de β -amiloide, los niveles de caspasa-3 y SOD2.

El modelo animal utilizado en este estudio, está genéticamente programado para expresar y acumular progresivamente A β y además éstos animales se trataron con Al. Está ampliamente reconocido que la exposición a Al aumenta la formación de A β y promueve su agregación (Kawahara et al., 2001; Ribes et al., 2008; Rodella et al., 2008; Walton, 2012a; Flynn y Melov, 2013; Wang et al.,

2016). Considerando esta información, en el presente estudio esperábamos encontrar una mayor acumulación de A β en los grupos tratados con Al que en los tratados con Mel. Sin embargo, solo apareció una tendencia en A β 1-40 y A β 1-42 en los tejidos analizados (córtex e hipocampo). Los resultados obtenidos indican que la Mel reduce la expresión o la acumulación de A β 1-40 y A β 1-42. Es importante remarcar cómo las medias de los valores de A β 1-40 en córtex e hipocampo y las de A β 1-42 en córtex del grupo AlCitMel mostraron valores de A β similares o inferiores a los de sus correspondientes grupos control (a pesar de que el grupo AlCit había mostrado las mayores medias de entre todos los tratamientos testados). Pensamos que éste podría ser el primer paso para encontrar diferencias que demostrarían que la coadministración de Mel durante el tratamiento con Al podía reducir la acumulación de A β en córtex e hipocampo.

Teniendo en cuenta las condiciones del experimento; hemos de valorar el largo periodo de tratamiento aplicado (14 meses) y la edad de los ratones en el momento de ser analizados. Cummings et al. (2015) usando también un modelo transgénico para la expresión de A β describió un aumento de entre 7 y 25 veces en la concentración de A β 1-40 and A β 1-42, respectivamente (en solo 4 meses). Wang et al. (2007) usando el mismo modelo de ratón que en este estudio, describió concentraciones de 7 ng A β 1-40/ mg de tejido y 1.5 ng A β 1-42/ mg de tejido, en córtex e hipocampo, respectivamente. En este estudio hemos encontrado valores de 50 ng A β 1-40/ mg de tejido y 20 ng A β 1-42/ mg de tejido en córtex y de 13 ng A β 1-40/ mg de tejido y 7 ng A β 1-42/ mg de tejido en hipocampo. También hemos de tener en cuenta que en los ratones Tg está descrito un aumento de la concentración de A β que puede llegar a ser de 5 a 14 veces (A β 1-40 y A β 1-42 respectivamente) de los 3 a los 9-10 meses de edad (Hsiao et al., 1996; Westerman et al., 2002; Ribes et al., 2008). Creemos que la larga duración del experimento (y por tanto las elevadas concentraciones de A β producidas por la edad de los animales) puede estar enmascarando las diferencias que podrían producir los diferentes tratamientos. Quizás por este motivo las diferencias observadas en la concentración de A β no han sido estadísticamente significativas.

Inesperadamente los grupos tratados con Cit mostraron una gran acumulación de A β en córtex e hipocampo en comparación con el grupo C-Tg (A β se evaluó solo en los grupos Tg). En relación con esto, en un estudio previo mostramos que el grupo Cit-Tg acumuló una mayor concentración de Fe y Mn (Di Paolo et al., 2014a) y se ha descrito que concentraciones nano molares de iones metálicos son suficientes para cambiar a la A β de la vía no amiloidogénica a la amiloidogénica y facilitar por tanto su agregación (Kamalinia et al., 2013; Walton, 2014). Uniendo toda esta información con el hecho de que utilizamos el Cit para aumentar la absorción del Al, es posible que el aumento de A β

encontrado responde al aumento de la absorción del Fe y el Mn en vez de ser un efecto directo del Cit (Maynard et al., 2002; Bush, 2003; Kawahara, 2005; Domingo, 2006; Shcherbatykh y Carpenter, 2007; Gómez et al., 2008).

En el presente estudio, el balance pro- y anti- apoptótico que decide la supervivencia de la célula se evaluó mediante la medida de los niveles de proteína de dos marcadores específicos; la Casp-3 considerada la principal efectora de apoptosis (Masumura et al., 2000; Ghribi et al., 2002; Juraver-Geslin y Durand, 2015) y la SOD2 una proteína clave en el funcionamiento y la supervivencia neuronal (Dasuri et al., 2013; Yan et al., 2013). Hay estudios en los que la sobreexpresión del gen *APP* ha demostrado estar relacionada con la expresión de Casp-3 y en consecuencia con la muerte neuronal tanto en córtex como en hipocampo, en otros modelos de ratones para la AD (Masumura et al., 2000).

Además, se han desarrollado modelos combinados de ratones para estudiar el efecto de la SOD2 sobre los niveles de A β . Un modelo de ratón, resultado del cruce de un SOD2 knock-out con un Tg19959, ha mostrado un aumento de la formación de placas de A β . Por otro lado, un modelo Tg2576 con sobreexpresión del gen de la SOD2 ha demostrado una reducción en la formación de placas de A β (Li et al., 2004; Massaad et al., 2009; Dasuri et al., 2013). La tendencia aparecida tanto en los niveles de A β como en los niveles de proteína Casp-3 y los de SOD2 mostró el mismo patrón. En todos los casos, los valores correspondientes al tratamiento AICitMel fueron inferiores a los del tratamiento AICit, apoyando una disminución del daño relacionada con la Mel, que está de acuerdo con resultados de investigaciones previas (Al-Olayan et al., 2015; Prakash y Sudhandiran, 2015).

En el presente estudio, los grupos wild-type mostraron mayores niveles de Casp-3 y SOD2 que los grupos Tg en todos los tejidos estudiados. Probablemente, los ratones wild-type reaccionaron más eficientemente contra el daño por apoptosis, potenciando la expresión de la SOD2 en neuronas sanas como método compensatorio. Por otro lado, hemos encontrado dos resultados inesperados; los altos niveles de proteína Casp-3 y SOD2 en córtex e hipocampo en los grupos wild-type y Tg tratados con Cit. Como hemos mencionado anteriormente, estos altos niveles de proteína parecen deberse al aumento de metales pesados encontrados (Di Paolo et al., 2014a). El Cu ha sido relacionado con un aumento del daño oxidativo y el Mn pueden inducir síndromes similares al Parkinson, como se ha descrito con anterioridad (Yokel, 2006; Wang et al., 2016).

Además, a pesar de que el poder antioxidante de la Mel ha sido ampliamente demostrado, este sorprendente efecto pro-oxidante ya ha sido descrito con anterioridad por Bondy et al., (2002) que describió un efecto pro-oxidante

dependiente de la dosis, en ratones expuestos a diferentes niveles de Mel durante 6 meses (de los 3 a los 9 meses de edad). Un gran número de propiedades se conocen de la Mel, parece cada vez más claro que no es un simple antioxidante. Es necesaria más investigación para esclarecer este efecto contradictorio de la Mel. Hasta ahora, los intentos de parar la progresión de los síntomas de la AD con antioxidantes no han resultado tan exitosos como los investigadores habríamos esperado. Un considerable número de investigaciones se han dirigido a esclarecer las causas de la AD, el mecanismo subyacente a la toxicidad de la A β , el balance pro- y anti- apoptótico, la producción de ROS, etc... y finalmente a encontrar una sustancia apropiada que pueda ser capaz de frenar o preferiblemente, revertir este daño.

6.4 RESUMEN GENERAL

Los animales Tg muestran una mayor actividad general y unos niveles de aprendizaje peores que los wild-type. También se ha visto efecto del genotipo en los valores de proteína Casp-3 y SOD2 que son siempre mayores en wild-type que en Tg.

En los animales tratados con Cit hay más concentración de Cu, Mn y Zn en córtex e hipocampo tanto en wild-type como Tg, aunque las diferencias solo fueron significativas en el caso del Mn y el Cu en el grupo Cit-Tg. También se ha encontrado una correlación entre Fe y Al que sugiere que compiten por un mecanismo de absorción común; esto explicaría también que en los grupos tratados con Cit, en los que no había Al, se encuentre más cantidad de Fe. Esta absorción de metales pesados parece estar provocando un aumento de la acumulación de A β así como de los niveles de proteínas Casp-3 y SOD2.

En el grupo Tg, los animales tratados con AlCit fueron los que mostraron un peor aprendizaje de todos los grupos estudiados. Al combinar el tratamiento con Mel se mejoró el aprendizaje de los ratones.

La Mel aumentó la actividad horizontal en los ratones Tg mientras que en los ratones wild-type la redujo; también mostró un efecto ansiolítico en ambos genotipos. También se observó un efecto inesperado de la Mel; parece ejercer un efecto pro-oxidante al administrarse en solitario.

Cuando se suplementa el tratamiento AlCit con Mel (tratamiento AlCitMel) parece que se reduce la expresión o acumulación de A β en los ratones Tg y los niveles de proteínas Casp-3 y SOD2 en el cerebro, tanto en wild-type como en Tg. Las mejoras observadas en este tratamiento (AlCitMel) no parecen deberse a una menor acumulación de metales en el cerebro ya que la Mel no los modificó.

7. CONCLUSIONES CONCESSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este estudio son las siguientes:

- La sobreexpresión del gen *APP* parece generar un aumento en la actividad general y también parece dificultar el aprendizaje de los animales Tg2576 en comparación con la cepa *wild-type*.
- El genotipo Tg no afecta a la retención de la tarea en el laberinto de agua de Morris.
- El tratamiento con aluminio y citrato provoca déficits de aprendizaje e impide la retención de la memoria a largo plazo en ratones Tg2576. Sin embargo, estos déficits mejoran cuando los animales son tratados con Mel (AlCitMel).
- De los tejidos corporales estudiados, la mayor concentración de aluminio se encontró en hueso de los animales tratados con aluminio y citrato, tanto en los *wild-type* como en los Tg2576. Entre los tejidos encefálicos, la mayor concentración de aluminio se encontró en el hipocampo de los animales tratados con aluminio y citrato, tanto en los *wild-type* como en los Tg2576.
- La Mel no parece tener ningún efecto sobre la concentración de los metales estudiados (Al, Fe, Cu, Mn y Zn) en ninguno de los tejidos analizados (hipocampo, córtex y cerebelo, hígado, riñón, bazo y fémur).
- A pesar de que no se apreció un efecto significativo del tratamiento con melatonina sobre la cantidad de A β en el córtex e hipocampo de ratones Tg2576, el grupo tratado con aluminio, citrato y melatonina mostró una acumulación de A β similar a la de sus respectivos controles.
- Los animales Tg2576 mostraron menores niveles tanto de caspasa-3 como de SOD2 en córtex e hipocampo. Sin embargo, las diferencias solo fueron significativas para la caspasa-3 y en hipocampo.
- Los grupos tratados con aluminio y citrato mostraron los mayores niveles de caspasa-3 y SOD2 tanto en los grupos *wild-type* como en Tg2576, en comparación con el resto de grupos evaluados. A pesar de ello, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.
- La melatonina no produjo un efecto protector significativo, en la reducción de los niveles de caspasa-3 y SOD2. No obstante, se observó una tendencia a disminuir la concentración de dichas proteínas en el grupo aluminio, citrato y melatonina.

9. BIBLIOGRAFÍA

Acuña-Catroviejo D., Martín M, Macías M, et al. 2001. Melatonin, mitochondria and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 30: 65-74.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2008. Toxicological Profile for Aluminum. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA. Ayton, S., Lei, P., Bush, A., 2013. Metallostatics in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 62: 76–89.

Akbulut KG., Gonül B., Akbulut H. 2008. Exogenous melatonin decreases age-induced lipid peroxidation in the brain. *Brain Res.* 1238: 31-35.

Akiyama H., Hosokawa M., Kametani F., Kondo H., Chiba M., Fukushima M., Tabira T. 2012. Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in AbPP and AbPP/tau transgenic mice. *Neuropathology.* 32: 390–397.

Al-Olayan EM., El-Khadragy MF., Abdel Moneim AE. 2015. The protective properties of melatonin against aluminium-induced neuronal injury. *Int J Exp Pathol.* 96(3): 196-202.

Allagui MS., Hachani R., Saidi S., Feriani A., Murat JC., Kacem K., El feki A. 2015. Pleiotropic protective roles of melatonin against aluminium-induced toxicity in rats. *Gen Physiol Biophys.* 34(4): 415-424.

Antunes Wilhelm E., Ricardo Jesse C., Folharini Bortolatto C., Wayne Nogueira C. 2013. Correlations between behavioural and oxidative parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: protective effect of melatonin. *Eur J Pharmacol.* 701: 65-72.

Arnich N., Sirot V., Riviere G., Jean J., Noel L., Guerin T., Leblanc JC. 2012. Dietary exposure to trace elements and health risk assessment in the 2nd French total diet study. *Food Chem Toxicol.* 50: 2432–2449.

Baydas G., Koz ST., Tuzcu M., et al. 2007. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. *J Pineal Res.* 43(3): 225-231.

Baño Ojalora B., Popovic N., Gambini J., Popovic M., Viña J., Bonet-Costa V., et al. 2012. Circadian system functionality, hippocampal oxidative stress, and spatial memory in the APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic model of Alzheimer disease: effects of melatonin or ramelteon. *Chronobiol Int.* 29: 822-834.

Behl C. 2000. Apoptosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 107(11): 1325-1344.

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

Braak H., Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 82: 239-259.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7; 72: 248-254.

Bubenik GA., Konturek SJ. 2011. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol*. 62:13-19.

Bush AI. 2003. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 26: 207-214.

Cao Z., Wang F., Xiu C., Zhang J., Li Y. 2017. Hypericum perforatum extract attenuates behavioral, biochemical, and neurochemical abnormalities in Aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rats. *Biomed Pharmacother*. 13; 91: 931-937.

Campbell A., Smith MA., Sayre LM., Bondy SC., Perry G. 2001. Mechanisms by which metals promote events connected to neurodegenerative disease. *Brain Res Bull*. 55, 125-132.

Carpentieri A., Marchionatti A., Areco V., Perez A., Centeno V., 2014. Tolosa de Talamoni N. Antioxidant and antiapoptotic properties of melatonin restore intestinal calcium absorption altered by menadione. *Mol Cell Biochem*. 387(1-2): 197-205.

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. *Nature Neuroscience*. 2(3): 271-276.

Cheng Y., Feng Z., Zhang QZ., Zhang JT. 2006. Beneficial effects of melatonin in experimental models of Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin*. 27: 129-139.

Colomina MT., Roig JL., Sánchez DJ., Domingo JL. 2002. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology*. 23: 775-781.

Comes G., Manso Y., Escrig A., Fernandez-Gayol O., Sanchis P., Molinero A., Giralt M., Carrasco J., Hidalgo J. 2017. Influence of Transgenic Metallothionein-1 on Gliosis, CA1 Neuronal Loss, and Brain Metal Levels of the Tg2576 Mouse

Model of Alzheimer's Disease. *Int J Mol. Sci.* 26; 18(2) doi: 10.3390/ijms18020251.

Corrales A., Martínez P., García S., Vidal V., García E., Flórez J., et al. 2013. Long-term oral administration of melatonin improves spatial learning and memory and protects against cholinergic degeneration in middle-aged Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *J Pineal Res.* 54: 346-358.

Cummings DM., Liu W., Portelius E., Bayram S., Yasvoina M., Ho SH., Smits H., Ali SS., Steinberg R., Pegasiou CM., James OT., Matarin M., Richardson JC., Zetterberg H., Blennow K., Hardy JA., Salih DA., Edwards FA. 2015. First effects of rising amyloid- β in transgenic mouse brain: synaptic transmission and gene expression. *Brain.* 138(Pt 7): 1992-2004.

D'Amelio M., Sheng M., Cecconi F. 2012. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends Neurosci.* 35(11): 700-709.

Dasuri K., Zhang L., Keller JN. 2013. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med.* 62: 170-185.

Decker M., Muñoz-Torrero D. 2016. Special Issue: "Molecules against Alzheimer". *Molecules.* 21(12). doi: 10.3390/molecules21121736.

Dermont M., Boutahrit K., Fekete V., Bolle F., Van Loco J. 2012. Migration of 18 trace elements from ceramic food contact material influence of pigment, pH, nature of acid and temperature. *Food Chem Toxicol.* 50: 734-743.

Di Paolo C., Cabré M., Domingo JL., Gómez M. 2014a. Melatonin does not modify the concentration of different metals in A β PP transgenic mice. *Food Chem Toxicol.* 70: 252-259.

Di Paolo C., Reverte I., Colomina MT., Domingo JL., Gómez M. 2014b. Chronic exposure to aluminum and melatonin through the diet: neurobehavioral effects in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Food Chem Toxicol.* 69: 320-329.

Ding J., Zhong Q., Zhang S., Cai W. 2015. Size- and shape-controlled synthesis and catalytic performance of iron-aluminum mixed oxide nanoparticles for NOX and SO₂ removal with hydrogen peroxide. *J Hazard Mater.* 283: 633-642.

Domingo JL., Gomez M., Sanchez DJ., Llobet JM., Corbella J. 1993. Effect of various dietary constituents on gastrointestinal absorption of aluminum from drinking water and diet. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 79, 377-380.

Domingo JL. 2006. Aluminum and others metals in Alzheimer's disease: A review of potential therapy with chelating agents. *J Alzheimers Dis.* 10: 331-342.

Domingo JL., Gómez M., Sánchez DJ., Llobet JM., Corbella J. 2013. Effect of various dietary constituents on gastrointestinal absorption of aluminum from drinking water and diet. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 79: 377-380.

Drüeke TB., Jouhannau P., Banide H., Lacour B., Yiou F., Raisbeck G. 1997. Effects of silicon, citrate and the fasting state on the intestinal absorption of aluminium in rats. *Clin Sci.* 92: 63–67.

Duce JA., Bush AI. 2010. Biological metals and Alzheimer's disease implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol.* 92: 1–18.

Eckert A., Keil U., Marques CA., et al. 2003. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* 66: 1627-1634.

El-Missiry MA., Othman AI., Al-Abdan MA., El-Sayed AA. 2014. Melatonin ameliorates oxidative stress, modulates death receptor pathway proteins, and protects the rat cerebrum against bisphenol-A-induced apoptosis. *Neurol Sci.* 15; 347(1-2): 251-256.

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.

Esparza JL., Gómez M., Romeu M., Mulero M., Sánchez DJ., Mallol J., Domingo JL. 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. 2016. The toxicity of aluminium in humans. *Morphologie.* 100(329): 51-55.

Exley C., Vickers T., 2014. Elevated brain aluminium and early onset Alzheimer's disease in an individual occupationally exposed to aluminium: a case report. *J. Med. Case Rep.* 8, 41. doi: 10.1186/1752-1947-8-41.

Fan LF., Xu DE., Wang WH., Yan K., Wu H., Yao XQ., Xu RX., Liu CF., Ma QH. 2013. Caspr interaction with Amyloid Precursor Protein reduces amyloid- β generation in vitro. *Neurosci Lett.* 548: 255-260.

Fekete V., Vandevijvere S., Bolle F., Van Loco J. 2013. Estimation of dietary aluminum exposure of the Belgian adult population: evaluation of contribution of food and kitchenware. *Food Chem Toxicol.* 55: 602–608.

Feng Z., Chang Y., Cheng Y., et al. 2004a. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic Mouse model of Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 37: 129-136.

Feng Z., Zhang JT. 2004b. Melatonin reduces amyloid beta-induced apoptosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Pineal Res.* 37: 257-266.

Feng Z., Zhang JT. 2004c. Protective effects of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med.* 37: 1790-1801.

Fernandez Martinez M., Castro Flores J., Pérez de Las Heras S., Mandaluniz Lekumberri A., Gordejuela Menocal M., Zarranz Imirizaldu JJ. 2008. Risk factors for dementia in the epidemiologic study of Mungualde Country (Basque Country, Spain). *BMC Neurol.* 15; 8: 39. doi: 10.1186/1471-2377-8-39.

Ferry G., Ubeaud C., Lambert PH., Bertin S., Coge F., Chomarat P., Delegrande P., Serkiz B., Bouchet JP., Truscot RJ., Boutin JA. 2005. Molecular evidence that melatonin is enzymatically oxidized in a different manner than tryptophan investigations with both indoleamine 2,3-dioxygenase and myeloperoxidase. *Biochem J.* 388: 205–215.

Flynn JM. and Melov S. 2013. SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 62: 4-12.

Frank B., Gupta S. 2005. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Ann Clin Psychiatry.* 17: 269-286.

Gallagher M., Burwell R., Buchinal M. 1993. Severity of spatial learning impairment in aging; development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci.* 107: 618-826.

García T., Esparza JL., Giralt M., Romeu M., Domingo JL., Gómez M. 2010a. Protective role of melatonin on oxidative stress status and RNA expression in cerebral cortex and cerebellum of AbPP transgenic mice after chronic exposure to aluminium. *Biol Trace Elem Res.* 135: 220–232.

Garcia T., Esparza JL., Nogués MR., Romeu M., Domingo JL., Gómez M. 2010b. Oxidative stress status and RNA expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. *Hippocampus.* 20 (1): 218-225.

García T., Ribes D., Colomina MT., Cabré M., Domingo JL., Gómez M. 2009. Evaluation of the protective role of melatonin on the behavioral effects of aluminum in a mouse model of Alzheimer's disease. *Toxicology*. 265: 49-55.

Ghribi O., DeWitt DA., Forbes MS., Herman MM., Savory J. 2001. Co-involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis: changes in cytochrome c, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of aluminum-treated rabbits. *Brain Res*. 903(1-2): 66-73.

Ghribi O., Herman MM., Savory J. 2002. The endoplasmic reticulum is the main site for caspase-3 activation following aluminum-induced neurotoxicity in rabbit hippocampus. *Neurosci Lett*. 324(3): 217-221.

Golub MS., Keen CL. 1999. Effects of dietary aluminum on pubertal mice. *Neurotoxicol Teratol*. 21: 595-602.

Gómez M., Esparza JL., Nogues MR., Giralt M., Cabré 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 AbetaPP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Toxicology*. 249 (2-3): 214-219.

González-Domínguez R., García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L. 2014. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics*. 6: 292-300.

Greger JL. 1993. Aluminum metabolism. *Annu Rev Nutr*. 13: 43-63.

Gulcin I., Buyukokuroglu ME., Kufrevioglu OI. 2003. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. *J. Pineal Res*. 34: 278-281.

Guo W., Sha S., Xing X., Jiang T., Cao Y. 2013. Reduction of cerebral A β burden and improvement in cognitive function in Tg-APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice following vaccination with a multivalent A β ₃₋₁₀ DNA vaccine. *Neurosci Lett*. 549: 109-115.

Harrison T., Churcher I., 2004. Behr D. Gamma-secretase as a target for drug intervention in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 7: 709-719.

Hardeland R., Pandi-Perumal SR., Cardinali DP. 2006. Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*. 38: 313-316.

He H., Dong W., Huang F. 2010. Anti-amyloidogenic and anti-apoptotic role of melatonin in Alzheimer disease. *Neuropharmacology*. 8: 211-217.

Hendrix S., Ellison N., Stanworth S., Tierney L., Mattner F., Schmidt W., Dubois B., Schneeberger A. 2015. Methodological Aspects of the Phase II Study AFF006 Evaluating Amyloid-beta -Targeting Vaccine AFFITOPE® AD02 in Early Alzheimer's Disease - Prospective Use of Novel Composite Scales. *J Prev Alzheimers Dis.* 2 (2): 91-102.

Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C., Harigaya Y., Younkin S., Yang F., Cole G. 1996. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 274 (5284): 99-102.

Jenwitheesuk A., Boontem P., Wongchitrat P., Tocharus J., Mukda S., Govitrapong P. 2017. Melatonin regulates the aging mouse hippocampal homeostasis via the sirtuin1-FOXO1 pathway. *EXCLI J.* 16: 340-353.

Jing Y., Wang Z., Song Y. 2004. Quantitative study of aluminum-induced changes in synaptic ultrastructure in rats. *Synapse.* 52: 292-298.

Juraver-Geslin HA. and Durand BC. 2015. Early development of the neural plate: new roles for apoptosis and for one of its main effectors caspase-3. *Genesis.* 53 (2): 203-224.

Kamalinia G., Khodaghali F., Atyabi F., Amini M, Shaerzadeh F., Sharifzadeh M., Dinarvand R. 2013. Enhanced brain delivery of deferasirox-lactoferrin conjugates for iron chelation therapy in neurodegenerative disorders: in vitro and in vivo studies. *Mol Pharm.* 10(12): 4418-4431.

Kandimalla R., Vallamkondu J., Corgiat EB., Gill KD. 2016. Understanding Aspects of Aluminum Exposure in Alzheimer's Disease Development. *Brain Pathol.* 26 (2): 139-154.

Kawahara M. 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 8: 171–182.

Kawahara M. and Kato-Negishi M. 2011. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's Disease: The integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *Int J Alzheimers Dis.* 8; 2011: 276393. doi: 10.4061/2011/276393.

Kawahara M., Kato M., Kuroda Y. 2001. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. *Brain Res Bull.* 55: 211-217.

Kawarabayashi T., Younkin LH., Saido TC., Shoji M. Ashe KH., Younkin SG. 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.

Khan A, Dobson JP, Exley C. Redox cycling of iron by Ab42. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 557-569.

King A., Troakes C., Aizpurua M., Mirza A., Hodges A., Al-Sarraj S., Exley C. 2017. Unusual neuropathological features and increased brain aluminium in a resident of Camelford, UK. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 12 doi: 10.1111/nan.12417.

Killin LO., Starr JM., Shiue JJ., Russ TC. 2016. Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC Geriatr.* 16: 175 doi: 10.1186/s12877-016-0342-y.

King DL., Arendash GW. 2002. Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav* 75: 627-642.

King DL., Arendash GW., Crawford F., Sterk T., Menendez J., Mullan MJ. 1999. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP (SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* 103: 145-162.

Konturek PC., Brzozowski T., Konturek SJ. 2011. Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 62 (2): 139-150.

Koseoglu E., Koseoglu R., Kendirci M., Saraymen R., Saraymen B. 2017. Trace metal concentrations in hair and nails from Alzheimer's disease patients: Relations with clinical severity. *J Trace Elem Med Biol.* 39: 124-128.

Kovács T., Cairns NJ., Lantos PL. 2001. Olfactory centres in Alzheimer's disease: olfactory bulb is involved in early Braak's stages. *Neuroreport.* 12: 285-288.

Krewski D., Yokel RA., Nieboer E., Borchelt D., Cohen J., Harry J., Kacew S., Lindsay J., Mahfouz AM., Rondeau V. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 10 Suppl 1: 1-269.

Kuller LH. 2007. Statins and dementia. *Curr Atheroscler Rep.* 9: 154-161.

Kumar V., Bal A., Gill KD. 2009. Aluminium-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 aluminum. *J Pineal Res.* 31: 102-108.

Lalonde R., Lewis TL., 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.

Lambert JC., Heath S., Even G., Campion D., Sleegers K., Hiltunen M., Combarros O., Zelenika D., Bullido MJ., Tavernier B., Letenneur L., Bettens K., Berr C., Pasquier F., Fiévet N., Barberger-Gateau P., Engelborghs S., De Deyn P., Mateo I., Franck A., Helisalmi S., Porcellini E., Hanon O., Pancorbo MM., Lendon C., Dufouil C., Jaillard C., Leveillard T., Alvarez V., Bosco P., Mancuso M., Panza F., Nacmias B., Bossù P., Piccardi P., Annoni G., Seripa D., Galimberti D., Hannequin D., Licastro F., Soininen H., Ritchie K., Blanché H., Dartigues JF., Tzourio C., Gut I., Van Broeckhoven C., Alperovitch A., Lathrop M, Amouyel P. 2009. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 41: 1094-1099.

Li F., Calingasan NY., Yu F., Mauck WM., Toidze M., Almeida CG., Takahashi RH., Carlson GA., Flint Beal M., Lin MT., Gouras GK. 2004. Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *J Neurochem.* 89 (5): 1308-1312.

Li XB., Zhang ZY., Yin LH., Schluesener HJ. 2012. The profile of b-amyloid precursor protein expression of rats induced by aluminum. *Environ Toxicol Pharmacol.* 33: 135–140.

Limson, J., Nyokong, T., 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.

Lione A., 1985. The reduction of aluminum in patients with Alzheimer's disease. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 6: 21–32.

Liu G., Huang W., Moir RD., Vanderburg CR., Lai B., Peng Z., Tanzi RE., Rogers JT., Huang X. 2006. Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol.* 155: 45–51.

Liu XJ., Yuan L., Yang D., Han WN., Li QS., Yang W., Liu QS., Qi JS. 2013. Melatonin protects against amyloid- β -induced impairments of hippocampal LTP and spatial learning in rats. *Synapse.* 67: 626-636.

Liu WC., Wang X., Zhang X., Chen X., Jin X. 2017. Melatonin Supplementation, a Strategy to Prevent Neurological Diseases through Maintaining Integrity of Blood Brain Barrier in Old People. *Front Aging Neurosci.* 24; 9: 165 doi: 10.3389/fnagi.2017.00165.

Luca L., Alessandro G., Sandra S., Antonio BV., Mercedes F., Matteo LM., Luciana G., Vania F., Salvatore R., Laura C. 2016. REAC technology modifies

pathological neuroinflammation and motor behaviour in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci Rep.* 6: 35719 doi: 10.1038/srep35719.

Luchetti F., Canonico B., Betti M., Arcangeletti M., Pilolli F., Piroddi M., Canesi L., Papa S., Galli F. 2010. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J.* 24: 3603–3624.

Ma T., Hoeffler CA., Wong H., Massaad CA., Zhou P., Iadecola C., Murphy MP., Pautler RG., Klann E. 2011. Amyloid β -induced impairments in hippocampal synaptic plasticity are rescued by decreasing mitochondrial superoxide. *J Neurosci.* 31(15): 5589-5595.

Magaia T., Uamusse A., Sjöholm I., Skog K. 2013. Dietary fiber, organic acids and minerals in selected wild edible fruits of Mozambique. *SpringerPlus.* 2: 88 doi: 10.1186/2193-1801-2-88.

Martín M., Macías M., Escames G., León J., Acuña-Castroviejo D. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 14(12): 1677-1709.

Massaad CA., Washington TM., Pautler RG., Klann E. 2009. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11; 106(32): 13576-13581.

Masumura M., Hata R., Nishimura I., Uetsuki T., Sawada T., Yoshikawa K. 2000. Caspase-3 activation and inflammatory responses in rat hippocampus inoculated with a recombinant adenovirus expressing the Alzheimer amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res.* 80(2): 219-227.

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-Iqbal I., Wilson GL., Ghiso J., Williams C., Refolo LM., Pappolla MA., Chain DG., Nerja E. 2003. Melatonin increases survival and inhibits oxidative and amyloid pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 85: 1101-1108.

Mauriz JL., Collado PS., Veneroso C., Reiter RJ., González-Gallego J. 2013. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J Pineal Res* 54: 1-14.

Maynard CJ., Bush AI., Masters CL., Cappai R., Li QX. 2005. Metals and amyloid in Alzheimer' disease. *Int J Exp Path.* 86: 147–159.

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.

Maynard CJ., Cappai R., Volitakis I., Cherny RA., White AR., Beyreuther K., Masters CL., Bush AI. 2002. Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-b opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem.* 277: 44670–44676.

McLachlan DR., Kruck TP., Lukiw WJ., Krishnan SS. 1991. Would decreased aluminium ingestion reduce the incidence of Alzheimer' disease? *CMAJ* 145: 793–804.

McKenna JT., Christie MA., Jeffrey BA., McCoy JG., Lee E., Connolly NP., Ward CP., Strecker RE. 2012. Chronic ramelteon treatment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Arch Ital Biol.* 150: 5-14.

Mendivil-Perez M., Soto-Mercado V., Guerra-Librero A., Fernandez-Gil BI., Florido J., Shen YQ., Tejada MA., Capilla-Gonzalez V., Rusanova I., Garcia-Verdugo JM., Acuña-Castroviejo D., López LC., Velez-Pardo C., Jimenez-Del-Rio M., Ferrer JM., Escames G. 2017. Melatonin enhances neural stem cell differentiation and engraftment by increasing mitochondrial function. *J Pineal Res.* 19. doi: 10.1111/jpi.12415.

Mehrzadi S., Safa M., Kamrava SK., Darabi R., Hayat P., Motevalian M. 2016. Protective mechanisms of melatonin against hydrogen-peroxide-induced toxicity in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 23: 1-14.

Miller E., Morel A., Saso L., Saluk J. 2015. Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Application in Neurodegenerative Disorders. *Curr Top Med Chem.* 15(2): 163-169.

Mirza A., King A., Troakes C., Exley C. 2017. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 40: 30-36.

Mukda S., Panmanee J., Boontem P., Govitrapong P. 2016. Melatonin administration reverses the alteration of amyloid precursor protein-cleaving secretases expression in aged mouse hippocampus. *Neurosci Lett.* 16; 621: 39-46.

Miu AC., Andreescu CE., VasIU R., Olteanu AI. A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *Int J Neurosci.* 113: 1197-1211.

Mold M., Ouro-Gnao L., Wieckowski BM., Exley C. 2013. Copper prevents amyloid- β (1-42) from forming amyloid fibrils under near-physiological conditions in vitro. *Sci Rep.* 3: 1256 doi: 10.1038/srep01256.

Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11: 47-60.

Murakami K., Murata N., Noda Y., Tahara S., Kaneko T., Kinoshita N., Hatsuta H., Murayama S., Barnham KJ., Irie K., Shirasawa T., Shimizu T. 2011. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 30; 286(52): 44557-44568.

Nayki U., Onk D., Balci G., Nayki C., Onk A., Çankaya M., Taskin Kafa AH., Kuzucu M. 2016. The effect of melatonin on oxidative stress and apoptosis in experimental diabetes mellitus-related ovarian injury. *Gynecol Endocrinol.* 32(5): 421-6.

Nelson TJ., Alkon DL. 2007. Protection against beta-amyloid-induced apoptosis by peptides interacting with beta-amyloid. *J Biol Chem.* 43: 31238-31249.

Newman M., Musgrave FI., Lardelli M. 2007. Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal model. *Biochim Biophys Acta.* 285-297.

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(2): 142-149.

O'Neal-Moffitt G., Delic V., Bradshaw PC., Olcese J. 2015. Prophylactic melatonin significantly reduces Alzheimer's neuropathology and associated cognitive deficits independent of antioxidant pathways in A β PP(swe)/PS1 mice. *Mol Neurodegener.* 11; 10: 27 doi: 10.1186/s13024-015-0027-6.

Olcese JM., Chao C., Mori T., Mamcarz MB., Maxwell A., Runfeldt MJ., Wang L., Zhang C., Lin X., Zhang G., Arendash GW. 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.

Pappolla MA., Simovich MJ., Bryant-Thomas T., Chyan YJ., Poeggeler B., Dubocovich M., Bick R., Perry G., Cruz-Sanchez F., Smith MA. 2002. The neuroprotective activities of melatonin against the Alzheimer beta-protein are not mediated by melatonin membrane receptors. *J Pineal Res.* 32(3): 135-142.

Pandi-Perumal Sr., Srinivasan V., Maestronin GJ., Cardinali DP., Poeggeler B., Hardeland R. 2006. Melatonin: Nature's most versatile biological sign?. *FEBS J.* 273: 2813-2838.

Percy ME., Kruck TP., Pogue AI., Lukiw WJ. 2011. Towards the prevention of potential aluminum toxic effects and an effective treatment for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* 105: 1505-1512.

Perl DP., Moalem S. 2006. Aluminum and Alzheimer's disease a personal perspective after 25 years. Review. *J Alzheimers Dis.* 9: 291-300.

Polimeni G., Esposito E., Bevelacqua V., Guarneri C., Cuzzocrea S. 2014. Role of melatonin supplementation in neurodegenerative disorders. *Front. Biosci.* 19: 429-446.

Praticò D., Uryu K., Sung S., Tang S., Trojanowski JQ., Lee VM. 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 16: 1138-1140.

Prakash A., Dhaliwal GK., Kumar P., Majeed AB. 2017. Brain biometals and Alzheimer's disease - boon or bane? *Biometals.* 29(3): 399-409.

Prakash D., Sudhandiran G. 2015. Dietary flavonoid fisetin regulates aluminium chloride-induced neuronal apoptosis in cortex and hippocampus of mice brain. *J Nutr Biochem.* 26(12): 1527-1539.

Querfurth HW. and LaFela FM. 2010. Alzheimer Disease. *N Engl J Med.* 362(4): 329-344.

Quinn J., Kulhanek D., Nowlin J., Jones R., Praticò D., Rokach J., Stackman R. 2005. Chronic melatonin therapy fails to alter amyloid burden or oxidative damage in old Tg 2576 mice: Implications for clinical trials. *Brain Res.* 1027: 209-213.

Ramos E., Egea J., de Los Ríos C., Marco-Contelles J., Romero A. 2017. Melatonin as a versatile molecule to design novel multitarget hybrids against neurodegeneration. *Future Med Chem.* 9(8): 765-780.

Reiter RJ. 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia.* 49: 654-664.

Reiter RJ. 1995. The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data. *Exp Gerontol.* 30: 199-212.

Reiter RJ., Tan DX., Fuentes-Broto L. 2010. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res.* 181: 127-151.

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.

Ribes D., Colomina MT., Vicens P., Domingo JL. 2010. Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure. *Current Alzheimer Reserch*. 7(5): 401-408.

Roberts BR., Ryan TM., Bush AI., Masters CL., Duce JA. 2012. The role of metallobiology and amyloid-b peptides in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 120: 149-166.

Rodella LF., Favero G., Rossini C., Foglio E., Bonomini F., Reiter RJ., Rezzani R. 2008. Aging and vascular dysfunction: beneficial melatonin effects. *Age (Dordr)*. 35: 103-115.

Rodella LF., Ricci F., Borsani E. 2008. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol Histopathol*. 23: 433-439.

Rodgers SP., Born HA., Das P., Jankowsky JL. 2012. Transgenic APP expression during postnatal development causes persistent locomotor hyperactivity in the adult. *Mol Neurodegener*. 18: 7-28.

Roig JL., Fuentes S., Colomina MT., Vicens P., Domingo JL. 2006. Aluminum restraint stress and aging: behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology*. 218: 112-124.

Rosales-Corral SA., Acuña Castroviejo D., Coto-Montes A., Boga JA., Manchester LC., Fuentes-Broto L., Korkmaz A., Ma S., Tan D.X., Reiter R.J. 2012. Alzheimer's disease pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J Pineal Res*. 52: 167-202.

Rudnitskaya EA., Muraleva NA., Maksimova KY., Kiseleva E., Kolosova NG., Stefanova NA. 2015. Melatonin Attenuates Memory Impairment, Amyloid- β Accumulation, and Neurodegeneration in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 47(1): 103-116.

Rusina R., Matěj R., Kašparová L., Kukul J., Urban P. 2011. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data transformation. *Neurotox Res*. 20(4): 329-333.

Scarmeas N., Stern Y., Tang MX., Mayeux R., Luchsinger JA. 2006. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 59(6): 912-921.

Scarmeas N., Luchsinger JA., Schupf N., Brickman AM., Cosentino S., Tang MX., Stern Y. 2009. Physical activity, diet and risk of Alzheimer's disease. *JAMA*. 302(6): 627-637.

Subash S., Essa MM., Al-Asmi A., Al-Adawi S., Vaishnav R., Braidy N., Manivasagam T., Guillemin GJ. 2014. Pomegranate from Oman Alleviates the Brain Oxidative Damage in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's disease. *J Tradit Complement Med*. 4(4): 232–238.

Subash S., Essa MM., Braidy N., Al-Jabri A., Vaishnav R., Al-Adawi S., Al-Asmi A., Guillemin GJ. 2016. Consumption of fig fruits grown in Oman can improve memory, anxiety, and learning skills in a transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Nutr Neurosci*. 19(10): 475-483.

Shukla M., Boontem P., Reiter RJ., Satayavivad J., Govitrapong P. 2017. Mechanisms of Melatonin in Alleviating Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 13 doi: 10.2174/1570159X15666170313123454.

Shcherbatykh I., Carpenter DO. 2007. The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 11(2): 191-205.

Silva AF., Aguiar MS., Carvalho OS., Santana L de N, Franco EC., Lima RR., Siqueira NV., Feio RA., Faro LR., Gomes-Leal W. 2013. Hippocampal neuronal loss decreased GFAP immunoreactivity and cognitive impairment following experimental intoxication of rats with aluminum citrate. *Brain Res*. 1491: 23-33.

Snigdha S., de Rivera C., Milgram NW., Cotman CW. 2014. Exercise enhances memory consolidation in the aging brain. *Front Aging Neurosci*. 3; 6: 3 doi: 10.3389/fnagi.2014.00003.

Stumm C., Hiebel C., Hanstein R., Purrio M., Nagel H., Conrad A., Lutz B., Behl C., Clement AB. 2013. Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition. *Neurobiol Aging*. 34(11): 2574-2584.

Sutherland JE., Greger JL. 1998. Kinetics of aluminum disposition after ingestion of low to moderate pharmacological doses of aluminum. *Toxicology*. 126: 115–125.

Suzen S. 2006. Recent developments of melatonin related antioxidant compounds. *Comb Chem High Throughput Screen*.9: 409-419.

Tay WM., Huang D., Rosenberry TL., Paravastu AK. 2013. The Alzheimer's amyloid- β (1-42) peptide forms off-pathway oligomers and fibrils that are distinguished structurally by intermolecular organization. *J Mol Biol*. 24; 425(14): 2494-2508.

Vila M., Przedborski S. 2003. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 4(5): 365-375.

Walton JR. 2009. Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology.* 30: 182-193.

Walton JR. 2012a. Cognitive deterioration and associated pathology induced by chronic low-level aluminum ingestion in a translational rat model provides an explanation of Alzheimer's disease, tests for susceptibility and avenues for treatment. *Int J Alzheimers Dis.* 914947 doi: 10.1155/2012/914947.

Walton JR. 2012b. Evidence that ingested aluminum additives contained in processed foods and alum-treated drinking water are a major risk factor for Alzheimer's disease. *Curr Inorg Chem.* 2:19-39.

Walton JR. 2013. Aluminum's involvement in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 35: 7-43.

Walton JR. 2014. Chronic aluminum intake causes Alzheimer's disease: applying Sir Austin Bradford Hill's causality criteria. *J Alzheimers Dis.* 40(4): 765-838.

Wang HX., Karp A., Winblad B., Fratiglioni L. 2002. Late-life engagement in social and leisure activities is associated with a decrease risk of dementia: a longitudinal study from the Kungholmen project *Am J Epidemiol.* 155(12): 1082-1087.

Wang J., Ho L., Chen L., Zhao Z., Zhao W., Qian X., Humala N., Seror I., Bartholomew S., Rosendorff C., Pasinetti GM. 2007. Valsartan lowers brain beta-amyloid protein levels and improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 117(11): 3393-3402.

Wang J., Wang Z. 2006. Role of melatonin in Alzheimer-like neurodegeneration. *Acta Pharmacol Sin.* 27: 41-49.

Wang P., Wang ZY. 2017. Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 35: 265-290.

Wang P., Wu Q., Wu W., Li H., Guo Y., Yu P., Gao G., Shi Z., Zhao B., Chang YZ. 2017. Mitochondrial Ferritin Deletion Exacerbates β -Amyloid-Induced Neurotoxicity in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 1020357 doi: 10.1155/2017/1020357.

Wang Z., Wei X., Yang J., Suo J., Chen J., Liu X., Zhao X. 2016. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neurosci Lett.* 1; 610: 200-206.

Werterman MA., Cooper-Blacketer D., Mariash A., Kotilinek L., Kawarabayashi T., Younkin LH., Carlson GA., Younkin SG., Ashe KH. 2002. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 22: 1858-1867.

Whitehead MW., Farrar G., Christie GL., Blair JA., Thompson RP., Powell JJ. 1997. Mechanisms of aluminum absorption in rats. *Am J Clin Nutr.* 65: 1446-1452.

World Health Organization. Aluminium in: 657. Aluminium (WHO Food Additive Series 24), <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je07.htm>, 1989.

World Health Organization. "Evaluation of certain food additives and contaminants in Sixty-seventh report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives". WHO Technical Report Series <http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/reports/trs940.pdf> (2007).

Wu X., Li J., Hu JN., Deng ZY. 2012. The effects of glutamate and citrate on absorption and distribution of aluminum in rats. *Biol Trace Elem Res.* 148: 83-90.

Wu XG., Wang SS., Miao H., Cheng JJ., Zhang SF., Shang YZ. 2016. *Scutellaria barbata* flavonoids alleviate memory deficits and neuronal injuries induced by composited A β in rats. *Behav Brain Funct.* 8; 12(1): 33 doi: 10.1186/s12993-016-0118-8.

Xiao Q., Yu W., Tian Q., Fu X., Wang X., Gu M., Lü Y. 2017. Chitinase1 contributed to a potential protection via microglia polarization and A β oligomer reduction in D-galactose and aluminum-induced rat model with cognitive impairments. *Neuroscience.* 355: 61-70.

Yan MH., Wang X., Zhu X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* 62: 90-101.

Yilmaz S., Unal F., Yüzbasioglu D., Celik M. 2012. DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro. *Toxicol Ind Health* PMID: 23188648.

Yokel RA. 2000. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology.* 21: 813-828.

Yokel RA. 2012a. Aluminum in food-the nature and contribution of food additives. *Food Additive.* 204-228.

Yokel RA., 2012b. The pharmacokinetics and toxicology of aluminum in the brain. *Curr Inorg Chem.* 2: 54–63.

Yokel RA. 2013. Aluminum. *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)* Elsevier. 57-63.

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.

Yu X., Li Z., Zheng H., Ho J., Chan MT., Wu WK. 2017. Protective roles of melatonin in central nervous system diseases by regulation of neural stem cells. *Cell Prolif.* 50(2) doi: 10.1111/cpr.12323.

Yumoto S., Kakimi S., Ohsaki A., Ishikawa A. 2009. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* 103: 1579-1584.

Zatta P., Tognon G., Carampin P. 2003. Melatonin prevents free radical formation due to the interaction between beta-amyloid peptides and metal ions [Al(III), Zn(II), Mn(II), Fe(II)]. *J Pineal Res.*35: 98-103.

Zhai M., Li B., Duan W., Jing L., Zhang B., Zhang M., Yu L., Liu Z., Yu B., Ren K., Gao E., Yang Y., Liang H., Jin Z., Yu S. 2017. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT3-dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res.* 13 doi: 10.1111/jpi.12419.

Zhang QL., Jia L., Jiao X., Guo WL., Ji JW., Yang HL., Niu Q. APP/PS1 transgenic mice treated with aluminum: an update of Alzheimer's disease model. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 25: 49-58.

Zhao S., Zhao J., Zhang T., Guo C. 2016. Increased apoptosis in the platelets of patients with Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Clin Neurol Neurosurg.* 143: 46-50.

Zhu P., Liu J., Shi J., Zhou Q., Liu J., Zhang X., Du Z., Liu Q., Guo Y. 2015. Melatonin protects ADSCs from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 19(9): 2232-2243.

Zhou Y., Harris WR., Yokel RA. 2008. The influence of citrate, maltolate and fluoride on the gastrointestinal absorption of aluminum at a drinking water-relevant concentration: A ²⁶Al and ¹⁴C study. *J Inorg Biochem.* 102: 798-808.

