



**EFFECTES NEUROCONDUCTUALS DE L'EXPOSICIÓ ORAL A ALUMINI EN UN  
MODEL ANIMAL DE LA MALALTIA D'ALZHEIMER  
Diana Ribes Fortanet**

**Dipòsit Legal: T. 725-2012**

**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.

**Diana Ribes Fortanet**

**EFECTES NEUROCONDUCTUALS DE L'EXPOSICIÓ ORAL  
A ALUMINI EN UN MODEL ANIMAL DE LA MALALTIA  
D'ALZHEIMER**

**TESI DOCTORAL**

**dirigida per la Dra. Maria Teresa Colomina Fosch i  
la Dra. Paloma Vicens Calderón**

**Departament de Psicologia**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Faig constar que el treball titulat "*Efectes neuroconductuals de l'exposició oral a alumini en un model animal de la malaltia d'Alzheimer*" que presenta Diana Ribes Fortanet per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la meua direcció al Departament de Psicologia d'aquesta universitat.

Tarragona, 20 d'Abril de 2011

M. Teresa Colomina Fosch

Paloma Vicens Calderón



## **AGRAÏMENTS**

A totes aquelles persones que han fet que l'aventura em resultara tan agradable...

**GRÀCIES!!!**



“Cuanto más uno sabe, más le queda qué saber.  
Con el saber crece al mismo paso el no saber,  
o mejor aún, el saber del no saber”

***Schlegel***





# ***ÍNDEX***



## I. INTRODUCCIÓ

### 1.1 Alumini

1.1.1 Toxicocinètica de l'alumini.....	8
1.1.2 Exposició humana a l'alumini .....	11
1.1.3 Efectes tòxics de l'Al.....	15

### 1.2 Malaltia d'Alzheimer

1.2.1 Factors de risc.....	25
1.2.2 Hipòtesi de la cascada $\beta$ -amiloide .....	29
1.2.3 Malaltia d'Alzheimer i alumini.....	32
1.2.4 Models animals de malaltia d'Alzheimer.....	34
1.2.5 Model per l'estudi de l'aprenentatge .....	37

### 1.3 Neurogènesi

1.3.1 Funcionalitat de les noves neurones.....	42
1.3.2 Factors moduladors de la neurogènesi.....	44
1.3.3 Neurogènesi i malaltia d'Alzheimer .....	45

## II. HIPÒTESI I OBJECTIUS ..... 51

## III. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Animals i tractament.....	55
3.2 Proves conductuals i cognitives .....	56
3.3 Recollida i processament de les mostres.....	59
3.4 Quantificació.....	60

Cèl·lules BrdU positives

Nivells de  $\beta$ -amiloide

Plaques de  $\beta$ -amiloide

## Acumulació d'Al

### IV. RESULTATS

#### 4.1 Fase experimental I ..... 65

**Article:** "Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease" D. Ribes, M.T. Colomina, P. Vicens, J.L. Domingo (2008) *Experimental Neurology* 214, 293-300.

**Article:** "Recognition memory and  $\beta$ -amyloid plaques in adult Tg2576 mice are not modified after oral exposure to aluminum" Diana Ribes, Margarita Torrente, Paloma Vicens, M. Teresa Colomina, Mercedes Gómez, Jose L. Domingo (en premsa) *Alzheimer Disease and Associated Disorders*.

#### 4.2 Fase experimental II ..... 97

**Article:** "Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure" D. Ribes, M.T. Colomina, P. Vicens, J.L. Domingo (2010) *Current Alzheimer Research* 7, 401-408.

**Article:** "Aluminum exposure reduces anxiety-like behavior in Tg2576 mice, but it does not affect  $\beta$ -amyloid levels" Diana Ribes, M. Teresa Colomina, Paloma Vicens, José L. Domingo (en revisió).

#### 4.3 Fase experimental III ..... 131

**Article:** "Prolonged oral aluminum exposure increases  $\beta$ -amyloid and impairs memory in a mouse model of Alzheimer's disease" Diana Ribes, Paloma Vicens, José Luís Domingo, Maria Teresa Colomina (en revisió).

### V. DISCUSSIÓ ..... 167

### VI. CONCLUSIONS ..... 179

<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>183</b>
<b>VIII. ANNEX .....</b>	<b>203</b>



## LLISTAT D'ABREVIACIONS

**A $\beta$** : Beta amiloide

**AD**: Malaltia d'Alzheimer

**Afssaps**: Agència francesa de seguretat sanitària

**Al**: Alumini

**APOE**: Apolipoproteïna E

**APP**: Proteïna precursora d'amiloide

**ATSDR**: Agència per al registre de substàncies tòxiques i malalties, EUA

**BDNF**: Factor neurotròfic derivat del cervell

**BrdU**: 5-Bromo-2'-deoxiuridina

**FDA**: Administració reguladora de menjar i drogues, EUA

**GFAP**: Proteïna àcida fibrilar de la glia

**LTP**: Potenciació a llarg termini

**LTD**: Depressió a llarg termini

**NeuN**: Proteïna nuclear neuronal específica

**NOAEL**: Dosi d'exposició en la que no s'observen efectes adversos

**OMS**: Organització mundial de la salut

**VEGF**: Factor de creixement endotelial vascular

**ZSG**: Zona subgranular

**ZSV**: Zona subventricular





# ***I. INTRODUCCIÓ***



## 1.1 Alumini

L'alumini, de símbol químic Al, és el tercer element (8%) i el metall més abundant a l'escorça terrestre. En la natura mai es troba com a ió lliure ja que és molt reactiu, per això es combina amb altres elements com l'oxigen, el fluor o silici. La font més important d'obtenció d'Al metàl·lic és el mineral anomenat bauxita. L'alumini presenta propietats fisicoquímiques especialment interessants per la indústria: té una baixa densitat (és tres vegades més lleuger que l'acer), és molt mal·leable i molt resistent a la corrosió ja que forma una capa protectora d'alúmina a la superfície. A més, és totalment reciclable.

Propietats	Valor
Color	Blanc-plata
Estructura cristal·logràfica	Cúbica centrada en les cares
Paràmetre reticular a 25°C	2.699 g/cc
Canvi volumètric durant la solidificació	6,70%
Calor de combustió	200 Kcal/at-gr
Punt de fusió	660,2°C

Taula 1: Propietats físiques de l'alumini.

Com a conseqüència de les propietats esmentades anteriorment, de la seva fàcil mecanització i del seu preu, és el metall més utilitzat després de l'acer des de mitjans del s. XX, segons les dades de producció del metall (Figura 1).

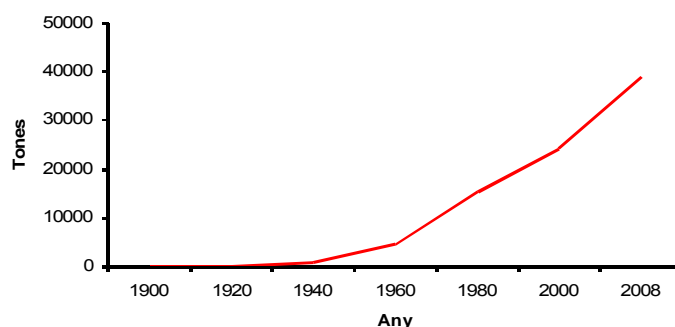


Figura 1: Evolució producció mundial d'Alumini. Dades extretes d'U.S. Geological Survey.

## Introducció

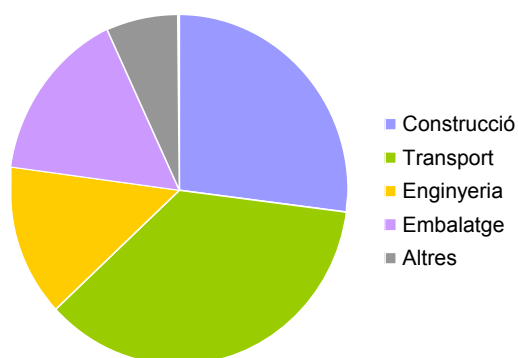


Figura 2: Representació sectors d'ús d'alumini a Europa, dades de l'European Aluminium Association.

L'alumini s'utilitza en àmbits tant variats com: la construcció, els transports, la mecànica, l'elèctric, el sector agroalimentari, la farmàcia, la cirurgia, la cosmètica i en el tractament de les aigües d'alimentació (Figura 2). Segons les dades de l'European Aluminium Association (EAA, 2006), a l'any 2006 en Europa es va consumir al voltant de 7,9 milions de tones d'Al primari i se'n van produir 3,8 milions de tones.

S'han descrit i desenvolupat nombrosos mètodes de determinació d'Al en matrius mediambientals i biològiques (Perl, 2001). Una de les majors dificultats per determinar la quantitat d'Al és la possibilitat de contaminació de la mostra, degut a la ubiqüitat del mateix.

S'han de prendre rigoroses precaucions en el moment d'obtenir, conservar i preparar la mostra, així com en l'anàlisi. Les tècniques que s'utilitzen en anàlisis rutinaris són les d'espectrometria de masses per plasma amb acoblament inductiu (ICP-MS) i l'espectrometria d'absorció atòmica electrotèrmica (SAA-ET) (Gourier-Fréry i Fréry, 2004).

### 1.1.1 Toxicocinètica de l'Al

**L'absorció** de l'alumini generalment és molt baixa; s'estima que més del 95% de l'alumini ingerit no s'absorbeix i és excretat en la femta (Gourier-Fréry i Fréry, 2004), mentre que l'alumini absorbit és excretat principalment en l'orina i, en menys mesura en la bilis. En general, podem dir que l'Al s'absorbeix poc quan la via d'administració és l'oral o inhalatòria i pràcticament no és absorbit a través de la pell.

En població general, la principal via d'exposició a l'Al és l'oral. La ingesta d'Al suposa el 95% de l'aport d'Al diari, tot i que l'absorció d'aquest és molt variada, i depen de factors com

el compost o l'espècie química en què es troba, de la composició de la dieta i de l'estat nutricional del subjecte.

Tot i que les xifres poden variar segons els estudis, s'estima que la quantitat d'Al ingerida diàriament és entre 2 i 30 mg (JEFCA, 2007; Frisardi i col·ls., 2010) i l'absorció pot variar entre el 0.01 i l'1 % (Moore i col·ls., 2000; Dinman, 2001; OEHHA, 2001). La presència de determinats compostos a la dieta com citrat, lactat, ascorbat, gluconat, succinat, tartrat, malat i oxalat poden augmentar la seva absorció (Krewski i col·ls., 2007). En canvi, altres com el fosfat o el silici s'uneixen a l'Al i en dificulten la seva absorció. L'Al també es troba en alguns medicaments en quantitats elevades, l'absorció en aquests casos és entre 10 i 100 vegades superior a l'absorbit a través de la dieta (Krewski i col·ls., 2007).

El principal mecanisme d'absorció intestinal és la difusió passiva. L'Al s'uneix a varis lligands en la sang i es distribueix a tots els òrgans, acumulant-se principalment en la melsa, el fetge, els ossos i els ronyons i en menor quantitat en el cervell, múscul, cor o pulmó (ATSDR, 2008). La captació cel·lular d'Al pels òrgans i teixits es creu que és relativament lenta i probablement la majoria es produeix a partir de l'alumini unit a la transferrina (Harris i Messori, 2002), així mateix és probable que la densitat de receptors de transferrina en diferents òrgans influeixi en la distribució d'alumini (ATSDR, 2008).

En animals exposats oralment s'ha observat l'acumulació de l'alumini en el cervell, ossos, músculs i en ronyons. L'alumini també travessa la placenta i s'acumula en el fetus. També s'ha trobat Al a la llet materna (Golub i col·ls., 1996).

La via respiratòria és descrita com una via minoritària d'exposició a l'Al en població general (Gourier-Fréry i Fréry, 2004). En circumstàncies normals els pulmons estan contínuament rebent alumini, principalment en forma de partícules de silicat i altres compostos poc solubles. Part de les partícules que contenen Al i que es dipositen al tracte respiratori són retingudes per l'acció mucocil·liar, es barregen amb la saliva i són empassades. S'ha suggerit que part de l'Al inhalat ho faria a través del sistema olfatiu i arribaria al cervell mitjançant el transport axonal retrògrad (Exley, 1996). S'estima que, en general, la fracció

## Introducció

absorbida pel pulmó estaria entre l'1 i el 3% (Yokel i McNamara, 2001; Nayak, 2002). La concentració pulmonar d'Al augmenta amb l'edat.

Pel que fa a la **distribució** de l'Al a l'organisme (Figura 3), cal dir que aquest es pot unir i formar complexos amb molècules de baix pes molecular (àcids orgànics, aminoàcids, nucleòtids, fosfats, i carbohidrats) o d'alt pes molecular (proteïnes, polinucleòtids, i glicosaminoglicans). Alguns d'aquests complexos són estables i condicionen la possibilitat d'eliminar l'Al en determinats teixits (ATSDR, 2008).

L'Al travessa la barrera fetoplacentària i hematoencefàlica i mostra un tropisme preferencial pels ossos. En sèrum, els nivells normals són d'1-3 µg/l (Liao i col·ls., 2004). De tot l'alumini que es troba al cos, aproximadament el 50% es troba a l'esquelet, mentre que als pulmons es registra una quarta part d'Al (ATSDR, 2008). En general, als pulmons el nivell normal d'Al és de 20 mg/kg (pes humit); aquest augmenta amb l'edat a conseqüència de l'acumulació de compostos insolubles d'Al que entren al cos mitjançant les vies respiratòries (ATSDR, 2008). Gran part de l'Al que trobem a les altres parts del cos prové de l'alimentació. Els nivells normals d'Al trobats al teixit ossi han estat reportats en 5-10 mg/Kg. Així mateix, també es troba Al a la pell humana, al tracte gastrointestinal, als ganglis limfàtics, a les glàndules suprarenals, i a les glàndules paratiroides (ATSDR, 2008).

La quantitat normal d'Al trobada en el cervell humà varia de 0.25 a 0.75 mg/kg pes/humit. La concentració d'Al és el doble en la substància grisa que en la substància blanca (Roider i Drasch, 1999). S'evidencia que a mesura que s'incrementa l'edat dels humans també s'incrementa la concentració d'Al al teixit cerebral, i al sèrum (ATSDR, 2008).

La principal via **d'eliminació** de l'Al absorbit és la renal. Estudis fets per estimar el ritme d'absorció i eliminació de l'Al indiquen que en la majoria dels adults sans es mantindria un estat constant amb poques variacions al llarg del temps, i s'incrementaria la quantitat d'Al al cos a mesura que s'envelleix. L'alumini s'elimina per via renal, per filtració glomerular, la capacitat del ronyó per eliminar-lo està limitada per la unió de l'Al a proteïnes plasmàtiques. L'excreció biliar de l'Al i l'afectació de les funcions hepàtiques pot contribuir a la toxicitat de l'Al (Krewski i col·ls., 2007). Rates crònicament intoxicades amb alumini

presenten alteracions en la secreció biliar i un increment de l'estrès oxidatiu en el teixit hepàtic (Gonzalez i col·ls., 2004; Gonzalez i col·ls., 2007).

A més a més, les baixes concentracions d'Al trobades en la femta després de l'administració intravenosa d'Al radioactiu assenyalen l'existència d'un cicle enterohepàtic, que consisteix en la continuació de la secreció biliar i la reabsorció intestinal fins que finalment l'excreció renal elimina el metall de l'organisme (Gourier-Fréry i Fréry, 2004).

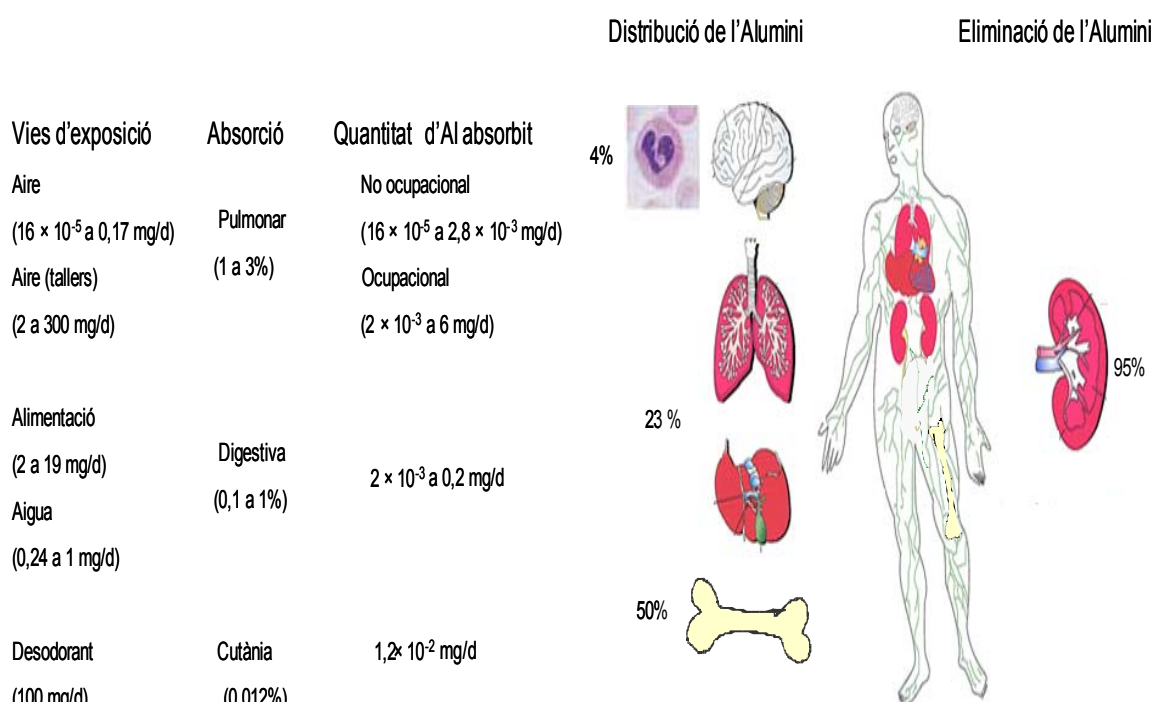


Figura 3: Dades diàries sobre l'exposició, absorció, distribució i eliminació de l'alumini. Figura adaptada de Gourier-Fréry i Fréry (2004).

### 1.1.2 Exposició humana a l'Al

L'exposició ocupacional es defineix com aquella a la qual està exposat un/a treballador/a en l'exercici de la seva professió i és deguda a la presència d'agents físics o d'elements químics en el lloc de treball, o a l'existència dels mateixos en el material que es manipula.

Com s'ha comentat abans, els productes de l'Al són utilitzats principalment en el sector del transport, la construcció i l'embalatge. En menor mesura l'Al és emprat en enginyeria



## Introducció

elèctrica i mecànica, equip d'oficina, estris domèstics, il·luminació, química i productes farmacèutics. Per tant, l'exposició es pot donar al llarg del cicle de vida del metall tant en el procés de refinament com en les indústries que utilitzen productes de l'Al (per exemple automobilística, avions, etc.) (Krewski i col·ls., 2007). Dintre del procés de producció primària de l'Al, l'exposició es produiria fonamentalment en el pas d'extracció i purificació inicial amb l'hidròxid i òxid d'Al. Pel que fa a l'electròlisi, l'exposició és principalment a òxid i fluorur d'Al, mentre que en la fundició és als fums parcialment oxidats del metall (Krewski i col·ls., 2007).

Les concentracions mesurades en l'aire de tallers que produeixen, refinen o utilitzen Al poden ser elevades. Els valors descrits són de l'ordre de  $\text{mg}/\text{m}^3$  en els llocs de soldadura d'Al ( $0,2\text{-}37,2 \text{ mg}/\text{m}^3$ ), en els llocs de producció de pols d'Al ( $5\text{-}21 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) i en els tallers d'afinació electrolítica del metall ( $0,2\text{-}4,9 \text{ mg}/\text{m}^3$ ). Aquestes quantitats són generalment més baixes en les fundicions ( $< 1 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) (Gourier-Fréry i col·ls., 2003).

Entenem per **exposició no ocupacional** aquella que es dona en humans en la seva vida quotidiana. Per a la població general, la principal via d'exposició al metall és l'oral. Tanmateix, existeixen altres vies d'exposició que comentarem a continuació.

L'Al es troba present a la dieta de tres formes: als propis aliments, als additius alimentaris i als embalatges. Tots els aliments, tant d'origen vegetal com animal, contenen Al. En la majoria dels casos, els continguts trobats se situen al voltant d'1 a 10  $\text{mg}/\text{kg}$  en pes humit (Gourier-Fréry i Fréry, 2004).

Diferents enquestes internacionals de consum mostren que l'aportació d'Al provinent de productes alimentaris se situa majoritàriament entre 5 i 12  $\text{mg}/\text{dia}$  (Gourier-Fréry i Fréry, 2004). La reglamentació europea (94/35/CE, 94/36/CE i la 95/2/CE) autoritza 11 additius alimentaris amb base d'Al: E173, E520-523, E541, E554-556 i E559.

La migració d'Al a partir dels embalatges, els estris i els recipients de begudes, depèn de la qualitat del material (puresa de l'Al), de l'existència d'un revestiment (plàstic o vernís) i de la duració del contacte. A aquestes variables s'afegeix el pH i la salinitat de l'aliment (amb un pH entre 4 i 8, la migració és ínfima, però a un pH inferior a 2, l'alumini és extret del

material). La JEFCA (Joint Expert FAO/WHO Committee Food Additives) va establir a l'any 1988 una dosi setmanal d'Al tolerable provisional de 7 mg per Kg de pes corporal. Aquest valor continua sent acceptat per l'Organització Mundial de la Salut (OMS).

L'aportació d'Al mitjançant l'aigua de distribució pública té tres orígens: presència natural en les aigües (silicoaluminats, hidròxids, formes lliures o complexes minerals o orgàniques), tractament de les aigües (sulfat d'Al i sals d'Al prepolímers), i el tractament de l'aigua de determinades xarxes d'edificis com a anticorrosiu.

Cal destacar que la concentració d'alumini en aigües naturals no molt àcides (p. ex. estanys, llacs, rierols) generalment és inferior a 0.1 mg/l (ATSDR, 2006).

Pel que fa al tractament d'aigües, estudis fets als EUA i Itàlia mostren que els nivells d'alumini a l'aigua potable després del tractament són inferiors a 7.4  $\mu\text{mol/l}$  (200  $\mu\text{g/l}$ ) (Driscoll i Letterman, 1995; Schintu i col·ls., 2000). Ara bé, és important tenir present que a l'aigua de consum els nivells d'Al poden ser molt variables ja que aquesta dada depèn del pH de l'aigua, de l'addició de coadjuvants de filtració i de la tecnologia utilitzada per purificar l'aigua, entre d'altres (Kvech i Edwards, 2002). En un estudi fet a Suècia per Rosborg i col·laboradors (2005) es van mesurar les concentracions d'alumini a l'aigua embotellada i va reportar un nivell mitjà del total d'Al d'1.33  $\mu\text{mol/l}$  (36  $\mu\text{g/l}$ ).

La font més gran d'Al que conté l'aire és el flux de partícules de pols del sòl i l'erosió de les roques (ATSDR, 2008). A més a més, l'activitat volcànica genera part de l'alumini contingut en la pols (Varrica i col·ls., 2000). Les activitats humanes com la mineria i l'agricultura contribueixen que aquesta pols sigui arrossegada pel vent. De fet, les emissions antropogèniques es produeixen principalment a l'atmosfera, es calcula que en un 13% (ATSDR, 2008).

Els nivells d'Al a l'aire generalment varien de 0.005-0.18  $\mu\text{g/m}^3$  en funció de la ubicació, les condicions meteorològiques i el nivell d'activitat industrial a la zona. Els nivells d'alumini en les zones urbanes i industrials poden ser més alts i poden arribar a 0.4-8  $\mu\text{g/m}^3$ . Les dades disponibles en els països europeus, Amèrica del Nord i Àsia assenyalen

## Introducció

concentracions compreses entre  $0.008 \mu\text{g}/\text{m}^3$  i  $7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ; les concentracions més elevades es van trobar a l'Àsia (Krewski i col·ls., 2007).

L'Al forma part de la composició d'un gran nombre de productes de bellesa en forma de sals i derivats solubles o insolubles susceptibles d'alliberar l'Al per reacció química. Els desodorants antitranspirants són els principals productes amb presència d'Al que reglamentàriament poden arribar a contenir un 20% de sals solubles d'Al. Altres productes cosmètics amb un volum de venda més gran com els tractaments facials i de cura del cos contenen sals solubles d'Al. Tanmateix, el seu contingut en sals solubles d'Al és molt inferior als dels antitranspirants (el 2% i l'1%, respectivament). Assajos fets en França per l'Afssaps per avaluar la seguretat d'ingredients cosmètics a l'any 2003 van estimar que l'aplicació diària d'antitranspirants a la pell era de 100 mg d'Al.

Per altra banda alguns components de l'Al són afegits a fàrmacs que es venen sense prescripció mèdica. Les dosis diàries que pot ingerir una persona que pren aquests fàrmacs han estat estimades en: 840-5000 mg (antiàcids); 130-730 mg (compostos tamponats) i 830 mg (en antiulcerants) (Soni i col·ls., 2001; ATSDR, 2006). A més a més, es troben nivells considerables d'Al en agents antidiarreics (1.450 mg per dosi) (ATSDR, 2006). Altres fàrmacs com els astringents, antisèptics, analgèsics, agents antimicrobians, medicaments tòpics, compostos dentals i pròtesi, entre d'altres contenen també alumini. També les vacunes poden contenir petites quantitats de compostos d'Al, com pot ser l'hidròxid, el fosfat o el sulfat d'Al. L'hidròxid d'alumini s'utilitza com a adsorbent i adjuvant de la immunitat en aproximadament el 40% de les vacunes (Gourier-Fréry i Fréry, 2004). Als EUA la FDA limita la quantitat d'alumini a  $0.85 \text{ mg/dosi}$  (ATSDR, 2006). A Europa, segons l'*European Aluminium Association*, la quantitat d'alumini present en les vacunes varia entre 0.3 i 1.5 mg/dosi. Per altra banda, els fàrmacs denominats antiàcids i antiúlceres pèptics són utilitzats molt freqüentment. Els consumidors regulars d'antiàcids representen una població exposada a quantitats elevades d'alumini. El consum d'antiàcids i compostos tamponats pot contribuir a la ingesta de milers de mg/dia d'alumini. En aquest sentit, es calcula que la quantitat d'alumini absorbida pel consum d'antiàcids i de compostos tamponats és de  $3,1 \times 10^{-1}$  i de  $4,3 \times 10^{-2} \text{ mg/kg}$  pes corporal/dia, respectivament (Krewski i col·ls., 2007).

Cal resaltar que en els pacients amb insuficiència renal, la diàlisi és la principal forma d'exposició a l'Al. Aquest pot provenir de l'aigua que s'utilitza per diluir les concentracions, de l'àcid líquid concentrat i de la pols de bicarbonat. Els valors límit d'Al a l'aigua utilitzada per diluir així com a l'àcid fixats per la Farmacopea Europea és de 10 µg/l i de 100 µg/l, respectivament. En aquests malalts l'hidròxid d'Al s'havia utilitzat com a quelant de fosfats però s'està reemplaçant per altres substàncies.

Dintre dels productes sanitaris la nutrició parenteral és una altra via d'exposició al metall. Per a les solucions de nutrició parenteral, la Farmacopea Europea imposa en relació al contenidor (ampolla de vidre o envasos de poliolfines, polipropilè o tereftalat de polietilè) un límit d'Al extraïble d'1 ppm. Pel que fa a la solució, la principal font d'Al que ja no s'utilitza actualment, era l'hidrolitzat de caseïna. Segons les avaluacions realitzades per Klein (1995) i Allwood (1999) en els additius utilitzats en les solucions d'alimentació parenteral l'Al oscil·lava de 8 a 7700 µg/l. El grup de treball de l'*European agency for the evaluation of medicinal products, Safety Working Party* (EMA) ha proposat recentment a la Farmacopea Europea establir un límit de 25 µg/l per a totes les formulacions parenterals. Aquest límit de 25 µg/l coincideix amb l'establert per la *Food and Drug Administration* (FDA) als Estats Units.

### 1.1.3 Efectes tòxics de l'Al

Diversos organismes nacionals i internacionals han establert valors de referència toxicològics per l'alumini (Taula 2). Els índexs toxicològics creats a partir d'estudis en animals o de dades obtingudes en humans, determinen la dosi d'Al a la qual un individu pot estar exposat sense registrar-se efectes adversos (*No-Observed-Adverse-Effect Level*, NOAEL). Els valors toxicològics de referència s'estableixen segons la durada d'exposició (aguda, subcrònica, crònica) i la via específica d'exposició. En el cas de l'Al, els valors toxicològics de referència es basen en estudis, la majoria d'ells antics. Cal, però, tenir en compte que en casos especials com els subjectes amb insuficiència renal, que no poden eliminar l'Al, aquest metall provoca efectes tòxics a dosis d'exposició més baixes que en població general.

## Introducció

Organisme	Via d'exposició	Duració de l'exposició	Sal d'Alumini	VTR establert per als humans	Efecte crític considerat
US EPA (1988)	Oral	Crònica	Fosfur d'Al	0,4 mg/kg/d	Reducció de pes
FAO/OMS (1989)	Oral	Crònica	Alumini	7 mg/kg/setmana	No precisat
ASCN/ASPE N (1990)	Parenteral	D'alguns dies a varies setmanes	Alumini	2 µg/kg/d (dosi sense efectes) 15 a 30 µg/kg/d (dosi de risc) 60 µg/kg/d (dosi tòxica)	Acumulació en teixits Alteració funció metabòlica
ATSDR (1999)	Oral	15 hores a 6 mesos	Lactat d'Alumini	2 mg/Kg/dia	Neuromotor
OEHHA-EPA (2001)	Oral (aigua)	Crònica	Alumini	0,45 a 0,70 mg/l	Neurodesenvolupament i immunotoxicitat

Taula 2: Valors toxicològics de referència (VTR) de l'alumini. Taula extreta de Gourier-Fréry i Fréry (2004).

En funció del temps d'exposició al tòxic, les intoxicacions poden ser agudes i cròniques. En les intoxicacions agudes es rep una sola dosi del tòxic. Generalment són dosis intravenoses o orals. Les intoxicacions agudes donen lloc a símptomes visibles i generalment greus; de fet, es pot produir la mort en pocs dies. La toxicitat aguda de l'Al és baixa. A conseqüència de la seva biodisponibilitat, les formes solubles d'Al (clorur, fluorur, sulfat i citrat d'Al) tenen una major toxicitat que les formes menys solubles com l'hidròxid d'Al.

En els éssers humans, hi ha poques dades sobre els efectes adversos associats amb l'exposició aguda a Al. Els efectes adversos associats amb la ingesta de grans quantitats d'Al, són trastorns gastrointestinals, erupció cutània, dolor muscular, i dos casos d'ulceració en llavis i boca conseqüència de la contaminació d'una xarxa d'aigua pel sulfat d'Al (concentracions que oscil·laren des de 30 a 620 mg/l) produït en 1988 a Cornouailles (Gourier-Fréry i Fréry, 2004).

Les intoxicacions cròniques són degudes, generalment, a petites quantitats d'una substància tòxica administrada durant molt de temps, amb una lenta acumulació en l'organisme. En el cas dels humans els estudis que han avaluat els efectes de l'exposició crònica a l'Al han estat realitzats principalment en persones exposades ocupacionalment en el

lloc de treball en les zones de producció i de la metal·lúrgia, i en pacients sotmesos a diàlisi. En aquests casos es poden presentar els efectes que s'enumeren a continuació.

### ***Efectes sistèmics***

El dipòsit excessiu d'Al en l'esquelet pot desencadenar una síndrome, comunament anomenada malaltia dels ossos induïda per alumini (*aluminium induced bone disease*, AIBD), que en l'ésser humà té dos tipus d'expressió: l'osteomalàcia i la malaltia òssia adinàmica ("adynamic bone disease" o ABD). Ambdues, es caracteritzen per una reducció de la remodelació òssia, però en l'osteomalàcia es produeix un augment del volum d'os no mineralitzat mentre que en la malaltia òssia adinàmica no s'observa aquest augment. Avui en dia encara no s'ha esclarit totalment el mecanisme que origina el trastorn a l'os. La majoria d'estudis publicats sobre el risc de l'Al en els sistema ossi en humans es refereixen a pacients renals.

D'altra banda, les cèl·lules miocàrdiques poden acumular alumini en els lisosomes (Nayak, 2002). Així mateix, l'acumulació d'Al en el miocardi i la cardiomiopatia han estat relacionades amb l'elevada prevalença d'arítmia i mort sobtada en pacients dialitzats (Nayak, 2002).

Amb la utilització d'algunes tècniques s'ha observat acumulació d'Al en el fetge (Krewski i col·ls., 2007), però encara que es trobin grans acumulacions d'Al la funció del fetge està rarament afectada gràcies a l'excreció biliar. En canvi, al sistema hematològic, els efectes de l'alumini es manifesten com una anèmia microcítica, i hipocròmica (Nayak, 2002).

En relació a la respiració, l'exposició a l'Al produeix sibilàncies, dispnea i danys en la funció pulmonar en els treballadors de les fundicions (Radon i col·ls., 1999; Burge i col·ls., 2000) exposats a la pols d'Al (ATSDR, 2008), i en els soldadors (Hull i Abraham, 2002; Abbate i col·ls., 2003). La fibrosi pulmonar és l'efecte respiratori més freqüent (Dinman, 2001; ATSDR, 2006). Altres patologies s'han relacionat amb l'Al com la pneumoconiosi, la proteinosis alveolar pulmonar, la pneumònia intersticial i els granulomes (ATSDR, 2006), així com símptomes de l'asma i d'hiperactivitat bronquial (Gourier-Fréry i Fréry, 2004).

## *Introducció*

També s'han descrit efectes de l'Al en el sistema reproductor, aquest s'acumula als testicles de rates exposades i altera la conducta sexual (Llobet i col·ls, 1995; Bataineh i col·ls, 1998).

## ***Efectes neurològics***

L'Al és un neurotòxic demostrat, tant en adults com durant el desenvolupament en humans i animals experimentals (Yumoto i col·ls., 2001).

En animals, l'Al produeix canvis neuroconductuals; disminució de l'activitat i la coordinació motora, deteriorament de l'aprenentatge, canvis histopatològics en el cervell i canvis bioquímics com per exemple l'augment de radicals lliures o canvis en alguns neurotransmissors (Colomina i col·ls, 2002; Garcia i col·ls., 2009). Aquests efectes s'han observat amb diferents sals d'Al, dosis, i diferents vies d'administració intracerebral, intraespinal, oral tant en l'aigua potable com en els aliments, fet que apunta que tots els tipus d'aportacions d'Al poden contribuir en l'aparició d'aquests efectes (Gourier-Fréry i Fréry, 2004). Per tal de prevenir els efectes neurològics en humans, el valor màxim recomanat per l'OMS és d'1 mg/kg/d.

En humans, l'encefalopatia va ser una de les primeres manifestacions de toxicitat de l'Al observada a l'any 1921 en un treballador de l'acer (Spofforth, 1921). Des d'aleshores, s'han descrit 30 casos al món en treballadors del sector de la metal·lúrgia exposats a Al durant molts anys. Tanmateix, no va ser fins la dècada dels 70 quan es va comprovar la seva capacitat com a neurotòxic en pacients amb insuficiència renal crònica tractats a llarg termini mitjançant diàlisi (Alfrey i col·ls., 1972). Inicialment anomenada "Demència dialítica", l'encefalopatia induïda per l'Al presenta, en una primera fase, trastorns del llenguatge amb parla lenta, disnòmia i dispràxia. A més a més, pot aparèixer tremolor, mioclònies, problemes de memòria i concentració, problemes psiquiàtrics (trastorns de personalitat, depressió, paranoia, al·lucinacions) i pèrdua de la consciència, que pot comportar la mort. Aquesta patologia es va relacionar amb l'Al contingut en el líquid de la diàlisi juntament amb la ingesta d'hidròxid d'Al necessari per controlar la hiperfosfatèmia dels pacients. En aquest cas van coincidir una mala eliminació de l'Al degut al problema renal amb un excés d'aportació d'Al

(Gourier-Fréry i Fréry, 2004). Les concentracions sèriques dels pacients amb encefalopatia són tres vegades superiors a les trobades en pacients que reben diàlisi però que no pateixen encefalopatia i 10 vegades superiors a les trobades en població sana (Gourier-Fréry i Fréry, 2004).

Tenint en compte els efectes tòxics de l'Al, la Farmacopea Europea ha reduït el nivell de referència de l'Al a l'aigua desmineralitzada utilitzada per a la dilució del líquid de diàlisi passant de 30 µg/l a 10 µg/l al 1992. Tot i no haver-hi un valor de referència per als nivells biològics d'Al, es recomana amb freqüència que la concentració sèrica no excedeixi de 40 a 50 µg/l. Si la concentració és més elevada els pacients són tractats amb deferoxamina (DFO), un quelant de l'Al que mobilitza l'Al acumulat en els teixits i permet la seva eliminació (Gourier-Fréry i Fréry, 2004). Aquestes substàncies utilitzades com a quelants semblen adients per prevenir l'aparició d'encefalopatia a l'Al que avui en dia només és descrita en casos de contaminació d'aigua de la diàlisi.

Alguns dels trastorns observats en malalts sotmesos a diàlisi com trastorns psicomotors, trastorns per dèficit d'atenció, coordinació motora, memòria immediata, alteracions visuals (Gourier-Fréry i Fréry, 2004), també s'han observat en treballadors exposats a l'Al (Gourier-Fréry i col·ls., 2003). Així mateix els treballadors poden manifestar alguns signes inespecífics que poden ser identificats amb diverses proves neuropsicològiques però que passen desapercebuts clínicament. Aquests es manifesten principalment per alteracions de l'estat d'ànim com és ara irritabilitat i fatiga, deteriorament de les habilitats motores, de l'organització visual-espacial i de la memòria. Existeix una correlació entre aquests trastorns i el nivell d'exposició a l'Al. Els treballs en què s'han trobat són en les feines de soldadura, fundicions, (Bast-Pettersen i col·ls., 2000; Riihimaki i col·ls., 2000), fusió (Iregren i col·ls., 2001) i en la fabricació de pols d'Al per pintures (Letzel i col·ls., 2000; Iregren i col·ls., 2001).

En nadons que van rebre nutrició parenteral prolongada (durant més de deu dies) es va trobar una puntuació més baixa en el desenvolupament mental mitjançant l'índex de Bayley, als 18 mesos d'edat. Aquestes solucions contenien 250 µg d'Al per litre (Gourier-Fréry i Fréry, 2004). Aquest estudi clínic aleatoritzat, planteja la repercussió que pot tenir en el



## *Introducció*

desenvolupament neurològic l'exposició a l'Al en estadis primerencs, tot i que caldria veure els efectes a llarg termini.

S'han proposat diversos mecanismes per explicar la neurotoxicitat de l'Al (Figura 4) (Nayak i Chatterjee, 1999):

- a) interferint amb el metabolisme de la glucosa, tot reduint la formació de precursors d'acetilcolina (afectant també a les catecolamines);
- b) alterant l'alliberació i recaptació a nivell presinàptic d'aminoàcids excitatoris i altres neurotransmissors per la interacció amb  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$  i  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPasa}$ ;
- c) modulant l'homeòstasi de calci intracel·lular ja que actua com un competidor de calci;
- d) augmentant la producció d'AMPc;
- e) produint canvis en proteïnes del citoesquelet,
- f) interactuant directament a nivell genòmic i alterant l'expressió gènica
- g) induint dany oxidatiu mitjançant la peroxidació de fosfolípids del cervell.

Al llarg dels anys són diversos els quadres clínics que s'han associat amb l'exposició a l'Al com per exemple: el parkinsonisme-demència de la península de Guam i Kii, l'esclerosi lateral amiotròfica, la demència parkinsoniana amb degeneració neurofibrilar, la degeneració neurofibrilar adjacent a l'harmatoma, l'encefalopatia dialítica, la síndrome estriatonigral, la demència alcohòlica amb desmielinització, les plaques senils de la malaltia d'Alzheimer i en cervells de gent gran (Nayak 2002). De fet, la relació entre exposició a l'Al i la malaltia d'Alzheimer va sorgir després que Klatzo i col·laboradors (1965) observaren cabdells neurofibrilars conseqüència de la injecció de sals d'Al en el cervell de conills, en qualsevol cas la relació entre l'exposició a l'Al i la malaltia d'Alzheimer és una qüestió controvertida. En els darrers anys però ha crescut l'interés per aquest tema.

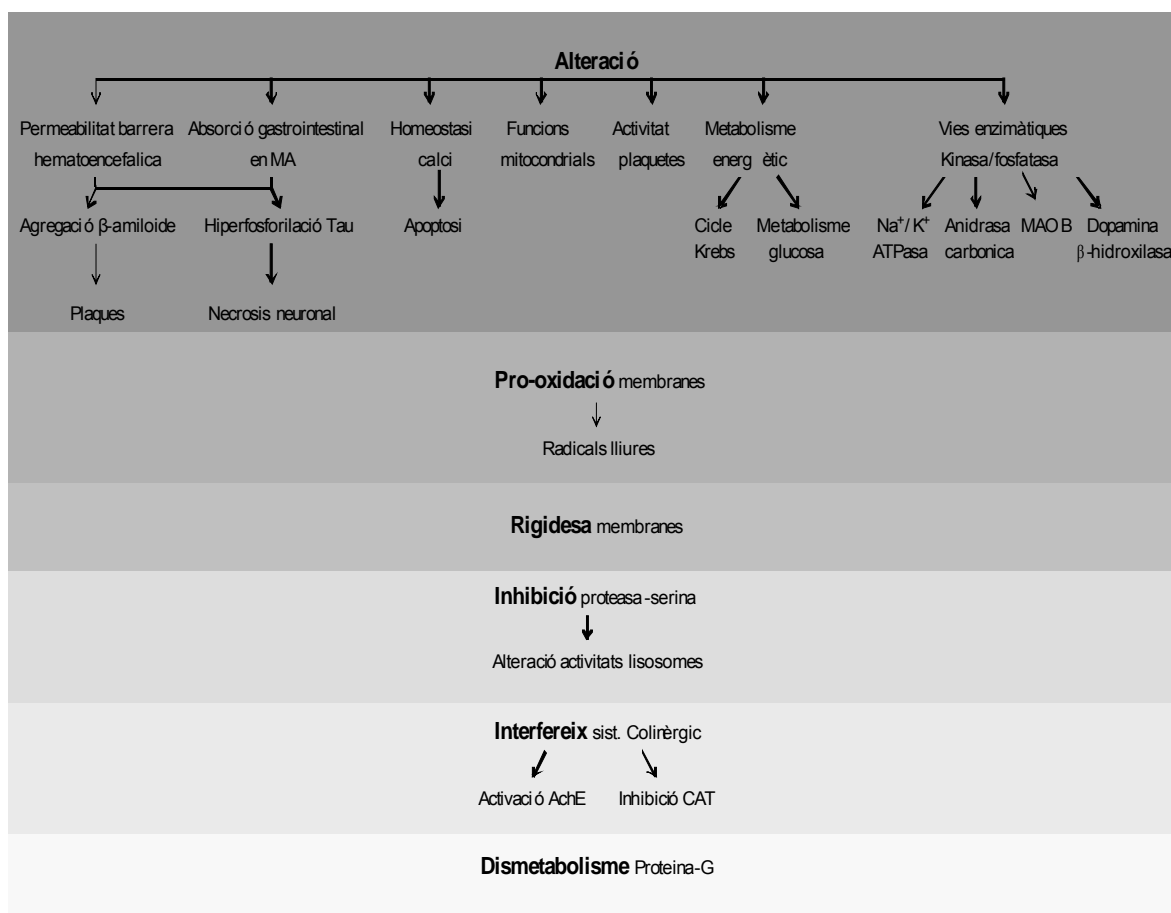


Figura 4: Processos bioquímics i biofísics produïts per l'alumini. Esquema adaptat de P. Zatta i col·ls (2003).

## 1.2 Malaltia d'Alzheimer

La demència es defineix com el deteriorament adquirit en les capacitats cognitives, que afecten la realització satisfactòria de les activitats de la vida diària (Flint i col·ls., 1998).

La malaltia d'Alzheimer (*Alzheimer's disease* (AD)) constitueix actualment la demència neurodegenerativa més freqüent. L'Alzheimer és una demència progressiva que té el dèficit de memòria com un dels seus símptomes més primerencs i pronunciats. Generalment, el pacient empitjora progressivament, mostrant problemes perceptius, del llenguatge i emocionals a mesura que la malaltia avança (Berciano, 2006).

## Introducció

El primer cas d'AD del qual es té notícia es va produir a l'inici del s. XX quan el psiquiatre i anatomopatòleg Alois Alzheimer va publicar l'estudi clínic i anatòmic del cas d'una dona de 51 anys d'edat que va morir després d'haver presentat durant 4 anys una demència progressiva amb una greu desorientació i al·lucinacions. L'estudi del cervell va mostrar, atrofia i alteracions dintre i fora de les neurones en determinades zones. Els símptomes de la malaltia com una entitat nosològica definida van ser identificats per un company d'Alzheimer, Emil Kraepelin, que valorant la importància de les troballes neuropatològiques realitzades per Alzheimer va decidir posar-li el seu nom a la malaltia.

La prevalença d'aquesta malaltia en majors de 65 anys és del 3-10% i supera el 25% després dels 85 anys, amb una incidència de l'1-2% en la població general. Pel que fa a les dades epidemiològiques, a l'any 2004 l'AD afectava a Espanya unes 250.000-400.000 persones. Tenint en compte l'envelliment progressiu de la població i la manca de tractament curatiu aquestes xifres experimentaran un fort creixement en els pròxims anys, i s'estima que a mitjans d'aquest segle podrien existir més d'1 milió d'afectats d'AD a Espanya (Molinuevo i Blesa, 2004).

Per realitzar el diagnòstic clínic de la malaltia el *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of the American Psychiatric Association* (DSM-IV-TR) proposa els criteris descrits a continuació (Taula 3).

### **F00 Demència Tipus Alzheimer**

A. La presència dels múltiples dèficits cognoscitius es manifesta per:

1. Deteriorament de la memòria (deteriorament de la capacitat per aprendre nova informació o recordar informació apresada prèviament)

Una o més de les següents alteracions cognoscitives:

a) afàsia (alteració del llenguatge)

b) apràxia (deteriorament de la capacitat per dur a terme activitats motores malgrat que la funció motora està intacta)

c) agnòsia (falles en el reconeixement o identificació d'objectes, malgrat que la funció sensorial està intacta)

d) alteració de l'execució (p. ex. planificació, organització, seqüenciació i abstracció)

B. Els dèficits cognoscitius en cadascun dels criteris A1 i A2 provoquen un deteriorament significatiu de l'activitat laboral o social i representen una pèrdua important del nivell previ d'activitat

C. El curs es caracteritza per un inici gradual i un deteriorament cognoscitiu continu

D. Els dèficits cognoscitius dels criteris A1 i A2 no es deuen a cap dels següents factors:

1) altres malalties del sistema nerviós central que provoquen dèficit de memòria i cognoscitius (p. ex. malaltia cerebrovascular, malaltia de Parkinson, corea de Huntington, hematoma subdural, hidrocefalia normotensiva, tumor cerebral)

2) malalties sistèmiques que poden provocar demència (p. ex. hipotiroïdisme, deficiència d'àcid fòlic, vitamina B2 i niacina, hipercalcèmia, neurosífilis, infecció per VIH)

3) malalties induïdes per substàncies

E. Els dèficits no apareixen exclusivament en els transcurso d'un delírium

F. L'alteració no s'explica millor per la presència d'un altre trastorn de l'eix I (p. ex. trastorn depressiu major, esquizofrènia)

### **F00.0 Demència Tipus Alzheimer, d'inici primerenc**

El seu inici és als 65 anys o abans

Amb delírium: Si el delírium s'afegeix a la demència

Amb idees delirants: Si les idees delirants són el símptoma predominant

Amb estat d'ànim depressiu: Si l'estat d'ànim depressiu és predominant (incloent els quadres clínics que compleixen tots els criteris per a un episodi depressiu major). No es deu realitzar el diagnòstic per separat de trastorns de l'estat d'ànim degut a malaltia mèdica

No complicat: si cap dels símptomes abans anomenats predomina en el quadre clínic actual

### **F00.1 Demència Tipus Alzheimer, d'inici tardà**

El seu inici és posterior als 65 anys

Amb delírium: Si el delírium s'afegeix a la demència

Amb idees delirants: Si les idees delirants són el símptoma predominant

Amb estat d'ànim depressiu: Si l'estat d'ànim depressiu és predominant (incloent els quadres clínics que compleixen tots els criteris per a un episodi depressiu major). No es deu realitzar el diagnòstic per separat de trastorns de l'estat d'ànim degut a malaltia mèdica

No complicat: si cap dels símptomes abans anomenats predomina en el quadre clínic actual

Especificar si: Amb trastorn de comportament

*Taula 3. Criteris diagnòstics de la malaltia d'Alzheimer DSM-IV-TR.*

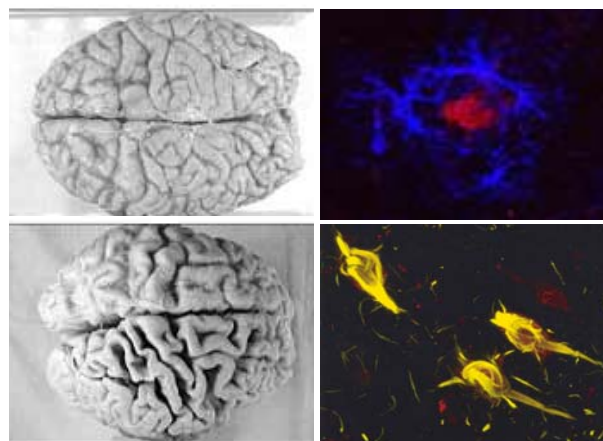
## *Introducció*

La malaltia es pot classificar segons el moment d'aparició: AD d'inici precoç quan el pacient té menys de 65 anys i AD d'inici tardà quan es manifesta després dels 65 anys. Al mateix temps, dintre d'aquests tipus podem diferenciar entre AD familiar, si existeix història familiar, i AD esporàdica, quan no hi ha antecedents familiars (Romano i col·ls., 2007).

El desenvolupament de l'AD és progressiu i en la seva evolució es poden identificar tres etapes. La primera, d'aparició gradual i amb una durada aproximada de 2-4 anys, es caracteritza per la confusió de noms i llocs, menor habilitat per recordar informació, pèrdua d'iniciativa i ansietat. La segona fase està caracteritzada principalment per un augment de la pèrdua de memòria i de la confusió, dificultat per reconèixer amics propers i familiars, i pèrdua de la facilitat del llenguatge. Aquesta segona etapa pot durar fins deu anys a partir del diagnòstic. La tercera fase dura entre un i dos anys. Té com a símptomes típics: la incapacitat per recordar la família i fins i tot a ells, pèrdua de pes, incapacitat per cuidar-se, incontinència, pèrdua total o parcial per utilitzar o entendre paraules, comportament depressiu, etc. Encara que la malaltia es manifesta mitjançant aquestes etapes, els especialistes matisen que el perfil simptomatològic pot variar i no manifestar-se tots els símptomes en un determinat pacient.

El tractament de la malaltia es pot aplicar a diferents nivells. El primer nivell involucra el tractament simptomàtic i inclou intervencions no farmacològiques (dieta, exercici, intervencions psicosocials) i teràpia farmacològica amb fàrmacs psicotròpics (antidepressius, neurolèptics i ansiolítics). Tot i que actualment no existeix un tractament efectiu, mentre es continua investigant l'etiologia de la malaltia i la seqüència de processos que es produeixen, els tractaments que reben les persones diagnosticades actualment per AD pretenen disminuir el progrés de la malaltia així com controlar els problemes en el comportament, la confusió i l'agitació per millorar la seva qualitat de vida. A conseqüència de l'afectació observada en l'AD en el sistema colinèrgic, gran part de les estratègies terapèutiques utilitzades augmenten la neurotransmissió colinèrgica principalment mitjançant la inhibició de l'acetilcolinesterasa (Mangialasche i col·ls., 2010).

Pel que fa a la fisiopatologia de l'AD, s'han descrit diverses alteracions histopatològiques (Figura 5) entre les quals destaquen una accentuada atrofia de l'escorça cerebral amb pèrdua de neurones corticals i subcorticals; la formació de plaques senils, consistents en acumulacions de proteïna beta amiloide (*amyloid beta* ( $A\beta$ )) amb degeneracions neurítiques; i els cabdells neurofibrilars, formats de parelles de filaments helicoidals de proteïna tau hiperfosforilada.



*Figura 5: Imatges signes anatomopatològics de la malaltia d'Alzheimer. Les imatges de l'esquerra mostren el cervell d'una persona sana (superior) i el d'una persona amb malaltia d'Alzheimer (inferior). Les imatges de la dreta mostren una placa senil (superior) i cabdells neurofibrilars (inferior).*

### 1.2.1 Factors de risc

La malaltia d'Alzheimer familiar representa entre l'1 i 5 % dels casos diagnosticats com Alzheimer i presenta una edat d'aparició anterior als 65 anys. És conseqüència de la transmissió autosòmica dominant de mutacions en els cromosomes 1 (presenilina 2), 14 (presenilina 1) ó 21 (*amyloid precursor protein* (APP)). Les mutacions en aquests gens estan relacionades amb la formació de plaques de  $\beta$ -amiloide (Gómez, 2003). La importància d'aquest factor de risc s'evidencia per l'augment de la freqüència d'aparició de la malaltia si es té un parent en primer grau amb la malaltia, i més encara si en són varis.

Ara bé, la majoria dels casos d'AD són d'aparició tardana, és a dir, la patologia per norma general, es manifesta després dels 65 anys i un dels factors de risc acceptats està relacionat amb l'apolipoproteïna E (APOE). El gen APOE està localitzat en el cromosoma 19 i té 3 al·lels principals:  $\epsilon 2, \epsilon 3$  i  $\epsilon 4$ . L'al·lel  $\epsilon 2$  mostra un efecte protector envers l'AD; per contra  $\epsilon 4$  augmenta el risc de patir AD. El  $\epsilon 4$  està present en el 15% de la població general i en un 40% en malalts d'Alzheimer. L'APOE  $\epsilon 4$  regula el colesterol, i n'augmenta l'absorció intestinal i els nivells en plasma. L'associació entre l'APOE  $\epsilon 4$  i les malalties vasculars, diabetis i demència juntament amb la presència de variables mediambientals augmenta parcialment el

## *Introducció*

risc de l'al·lel. Malgrat que el gen APOE  $\epsilon 4$  ha estat el més estudiat i involucrat amb l'aparició tardana de l'AD i s'ha associat amb canvis cerebrals, menys del 50% dels casos d'AD esporàdica són portadors de l'al·lel  $\epsilon 4$  de l'APOE (Rocchi i col·ls., 2003). L'absència del mateix en la majoria de casos de l'AD esporàdica apunten que falten per identificar factors de risc genètics i ambientals (Bendlin i col·ls., 2010). Actualment, es continua investigant la relació entre la genètica i l'AD i s'ha trobat que hi ha molts gens candidats ubicats a diferents cromosomes que poden incrementar o disminuir el risc de patir la malaltia (Taula 4).

En l'AD de tipus esporàdic, l'etiopatogènia és multifactorial. Existeixen diversos factors de risc identificats com ara, la predisposició genètica, l'edat, i factors de risc exògens o ambientals que semblen afavorir el seu desenvolupament (Taula 5)(Migliore i Coppede, 2009). Es considera que els factors genètics i ambientals associats entre si són necessaris en l'etiologia de la malaltia d'Alzheimer de tipus esporàdic, però no suficients. Els resultats dels estudis epidemiològics assenyalen l'edat com un dels factors de risc més important per patir Alzheimer. De fet, tots els treballs mostren que existeix un augment exponencial de les xifres d'incidència i prevalença a mesura que es compleixen anys (Launer i Hofman, 2000a). En general, l'edat avançada (ser major de 65-70 anys) afavoreix l'aparició de malalties neurodegeneratives. En aquest sentit l'AD és més freqüent a partir dels 65 anys. Passada aquesta edat, cada cinc anys es duplica aquest risc (Martínez i Robles, 2001).





## *Introducció*

Cal destacar que la incidència de l'AD en dones és 1.5-3 vegades més gran que la incidència en homes (Baum, 2005). El risc de l'AD en dones s'incrementa amb la menopausa (Gandy i Duff, 2000; Manly i col·ls., 2000), apuntant a la deficiència estrogènica com a factor de risc per desenvolupar AD. Els estrògens redueixen la formació de  $\beta$ -amiloide (Chang i col·ls., 1997; Morinaga i col·ls., 2007) i protegeixen in vitro envers els seus efectes tòxics (Marin i col·ls., 2003). A més, factors de risc associats a malalties del cor i accidents cerebrovasculars, com alta pressió arterial i colesterol alt, també poden augmentar el risc de desenvolupar l'AD (Launer i col·ls., 2000b; Kivipelto i col·ls., 2002; Schmidt i col·ls., 2002; Gustafson i col·ls., 2003; Arvanitakis i col·ls., 2004; Craft, 2007). El risc de l'AD està també elevat en pacients que pateixen diabetis, en particular de tipus 2, així com en aquells que presenten hiperinsulinèmia (Luchsinger i col·ls., 2004).

Els factors mediambientals tenen un pes molt important en l'etiopatogènia de la malaltia, tenint en compte que les formes familiars són les menys freqüents i els factors genètics de risc que s'han trobat són pocs. Existeixen alguns factors protectors que disminueixen el risc de l'AD com la dieta saludable (Scarmeas i col·ls., 2009), el consum moderat d'alcohol (Peters i col·ls., 2008; Anstey i col·ls., 2009), l'activitat social (Fratiglioni i col·ls., 2004; Hakansson i col·ls., 2009), l'educació (Sando i col·ls., 2008) o l'activitat mental (Friedland i col·ls., 2001) i l'activitat física (Lautenschlager i col·ls., 2008; Hamer i Chida, 2009). Altres factors mediambientals estarien relacionats de manera negativa amb l'AD: l'estrès, l'exposició a alguns metalls (alumini, zinc, coure), pesticides, solvents, camps electromagnètics i d'altres (Migliore i Coppede, 2009).

Potencials factors de risc per desenvolupar Malaltia d'Alzheimer
1. Factors genètics <ul style="list-style-type: none"><li>- Mutacions causals (APP, PS1, PS2)</li><li>- Historia familiar</li><li>- Genotip APOE4</li><li>- Altres gens susceptibles</li></ul>
2. Factors demogràfics <ul style="list-style-type: none"><li>- Edat (edat de màxim risc 70-85 anys)</li><li>- Gènere (dones &gt; homes)</li><li>- Lloc de residència</li><li>- Educació</li></ul>
3. Antecedents mèdics <ul style="list-style-type: none"><li>- Accidents cerebrovasculars</li><li>- Alteracions cardiovasculars</li><li>- Traumatisme craneoencefàlic</li><li>- Processos infecciosos (herpes simple, prions)</li><li>- Malaltia tiroïdal</li><li>- Depressió</li></ul>
4. Altres <ul style="list-style-type: none"><li>- Tòxics</li><li>- Dieta i nutrició</li><li>- Estrès</li></ul>

*Taula 5: Factors de risc de la malaltia d'Alzheimer, informació extreta de R. Cacabelos (2001).*

## 1.2.2 Hipòtesi de la cascada beta amiloide

Existeixen diverses teories que intenten explicar l'etiologia de l'AD. Aquestes estan relacionades amb les diferents troballes realitzades en l'aspecte anatòmic, cel·lular i molecular: atrofia de l'escorça cerebral, presència de plaques extracel·lulars d'A $\beta$ , cabdells neurofibrilars de proteïna tau intracel·lular, disminució en la neurotransmissió d'acetilcolina, processos d'excitotoxicitat, dany oxidatiu i inflamació.

El descobriment en algunes formes familiars de l'AD de formes mutades del gen que codifica la proteïna precursora d'amiloide ubicat en el cromosoma 21 juntament amb l'observació prèvia que els malalts amb trisomia del cromosoma 21 (síndrome de Down) desenvolupen amb l'edat canvis neuropatològics de l'AD de forma pràcticament invariable, va apuntar com a esdeveniment primari en la patogènia d'aquesta malaltia l'acumulació d'A $\beta$

## Introducció

(Gómez, 2003). És per aquest motiu que l'anomenada *Hipòtesi de la cascada beta amiloide* és considerada com una de les més acceptades a l'hora d'intentar explicar la seqüència de processos patològics que es desencadenen en la malaltia.

La hipòtesi de la cascada  $\beta$ -amiloide postula que la producció i l'acumulació de pèptids amiloides en el cervell és el factor primari que desencadena la patologia. Les altres característiques patològiques (formació de cabdells neurofibrilars, dany i mort cel·lular) serien generades a conseqüència dels efectes de la proteïna precursora de  $\beta$ -amiloide.

En 1984, Glenner i Wong van aïllar i seqüenciar la proteïna fonamental de les plaques senils, una proteïna de 40 a 42 aminoàcids anomenada proteïna beta amiloide. Posteriorment, van esbrinar que l'A $\beta$  formava part d'una proteïna de major mida anomenada proteïna precursora d'amiloide de la que es deriva mitjançant proteòlisi. L'APP és codificada per un gen localitzat en el cromosoma 21, format per 18 exons, existint 7 isoformes, que es produeixen per processaments alternatius d'aquests exons. Aquestes isoformes tenen un mida de 365, 563, 695, 714, 751 i 770 aminoàcids. De totes elles, les isoformes 695, 751 i 770 són les que més importància tenen en l'AD, ja que la resta, o no contenen la seqüència A $\beta$  i, per tant, no poden generar plaques senils, o no s'expressen en el cervell (Turner i col·ls., 2003).

La proteïna precursora d'amiloide és una proteïna transmembranosa localitzada especialment en les prolongacions de les neurones, que existeix en totes les espècies animals i que apareix aviat en l'evolució. El seu extrem amino (-NH<sub>2</sub>) es situa en la part extracel·lular i conté un domini amb activitat proteasa i un altre que fixa calci. La zona intramembranosa conté el futur amiloide (A $\beta$ ). El seu catabolisme es realitza mitjançant secretases

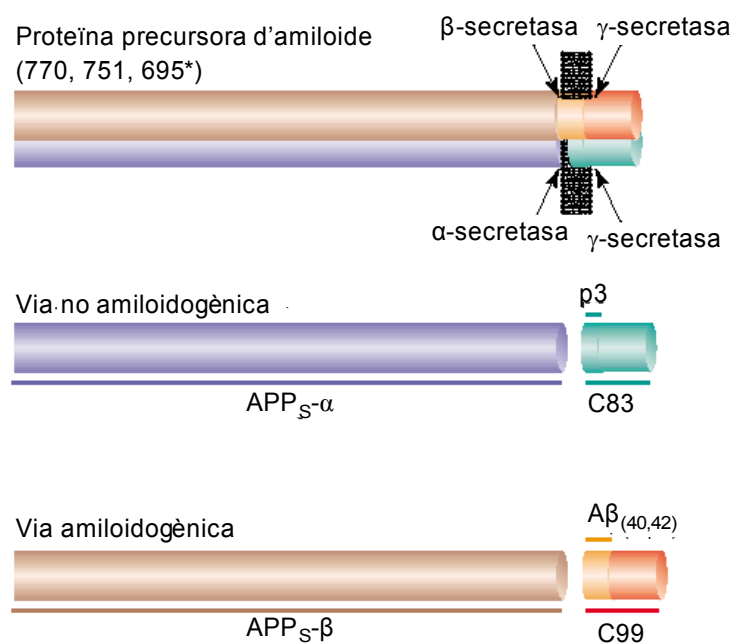


Figura 6: Processament proteïna precursora d'amiloide. Imatge modificada de P. F. Chapman i col·ls., (2001).

( $\alpha$ ,  $\gamma$  i  $\beta$ ) modulades per presenilines. La via  $\alpha$  dóna lloc a proteïnes i pèptids solubles (APPs) que actuen sobre receptors de membrana i sobre mecanismes intraneuronals, regulant també l'homeòstasi de calci intra/extracel·lular. Els seus efectes són necessaris per al manteniment, resistència, creixement, i adaptació de les neurones. Els fragments d'APPs es metabolitzen totalment i no s'acumulen. Per via de la  $\beta$ -secretasa es produeix un pèptid insoluble, el  $\beta$ -amiloide, que s'acumula sobre les membranes neuronals, tot formant les plaques d'A $\beta$ , i produeixen alteracions d'aquestes i dels seus receptors i alteracions de l'homeòstasi del calci (Newman i col·ls., 2007).

Els mecanismes de citotoxicitat pels quals actua l'A $\beta$  són, per una banda, l'activació immune (microglia) que es tradueix en inflamació, alliberació de citoquines, neurotoxicitat directa i estrès oxidatiu. A més a més, pot induir apoptosi mitjançant l'enzim A $\beta$ -alcohol deshidrogenasa, unint-se al mitocondri. En aquest sentit, s'han trobat alts nivells d'aquest enzim en pacients amb AD (Pavez i Ramírez, 2007).

Per l'altra banda, l'A $\beta$  altera la microcirculació mitjançant la seva acumulació en arterioles i capil·lars, i afecta els contactes sinàptics. Aquest últim mecanisme de dany cel·lular seria producte de l'acumulació d'oligòmers petits d'A $\beta$  involucrats en la disfunció de

### *Introducció*

les sinapsis colinèrgiques i glutamatèrgiques. L'excitotoxicitat, produeix gran alliberació de glutamat des de les cèl·lules glials, que es tradueix en l'activació exagerada de receptors N-metil-D-Aspartato, cosa que genera l'augment de calci intracel·lular, fet que al mateix temps activa l'òxid nítric sintetasa i provoca dany oxidatiu (Pavez i Ramírez, 2007).

Així doncs, el denominador comú dels efectes i els factors de risc genètic identificats fins al moment en l'AD és que tots ells alteren per diversos mecanismes, alguns encara per esclarir, el metabolisme de l'APP. Aquesta alteració origina el pèptid A $\beta$  que dona lloc a un augment molt significatiu, especialment, de la subespècie més llarga d'aquest pèptid A $\beta$  1-42 en el plasma, i el cervell d'aquests pacients (Gomez-Isla i col·ls., 1999; Findeis, 2007).

Aquest és un dels arguments més sòlids esgrimits a favor d'aquesta hipòtesi, segons la qual l'alteració en el metabolisme de l'APP i el seu derivat, A $\beta$  desencadenarien la cascada que en última instància desembocaria en el canvis neuropatològics (Figura 7) i els trastorns cognitius que caracteritzen aquesta malaltia (Crouch i col·ls., 2008). Curiosament no n'hi ha una bona correlació entre el número de plaques senils i els dèficits cognitius observats en la malaltia d'Alzheimer.

### **1.2.3 Malaltia d'Alzheimer i Alumini**

Els factors mediambientals, com hem comentat anteriorment, tenen una importància fonamental en el desenvolupament de l'AD, en aquest sentit la possible associació entre l'exposició a l'Al i la malaltia d'Alzheimer actualment continua sent una qüestió oberta. Va ser apuntada per primera vegada a mitjans dels anys 60 quan es va observar que la injecció de sals d'Al en el cervell de conills va provocar neurodegeneració fibrilar (Klatzo i col·ls., 1965). Posteriorment aquesta troballa va ser replicada per un altre grup d'investigadors en gats. A més a més, van demostrar que la quantitat d'Al era més elevada en el cervell de pacients amb malaltia d'Alzheimer; aquest augment era més pronunciat en l'hipocamp, estructura cerebral relacionada amb l'aprenentatge i on més freqüentment s'observen les lesions en l'AD (Crapper i col·ls., 1973). Tanmateix, des d'un punt de vista bioquímic existeixen altres fets que

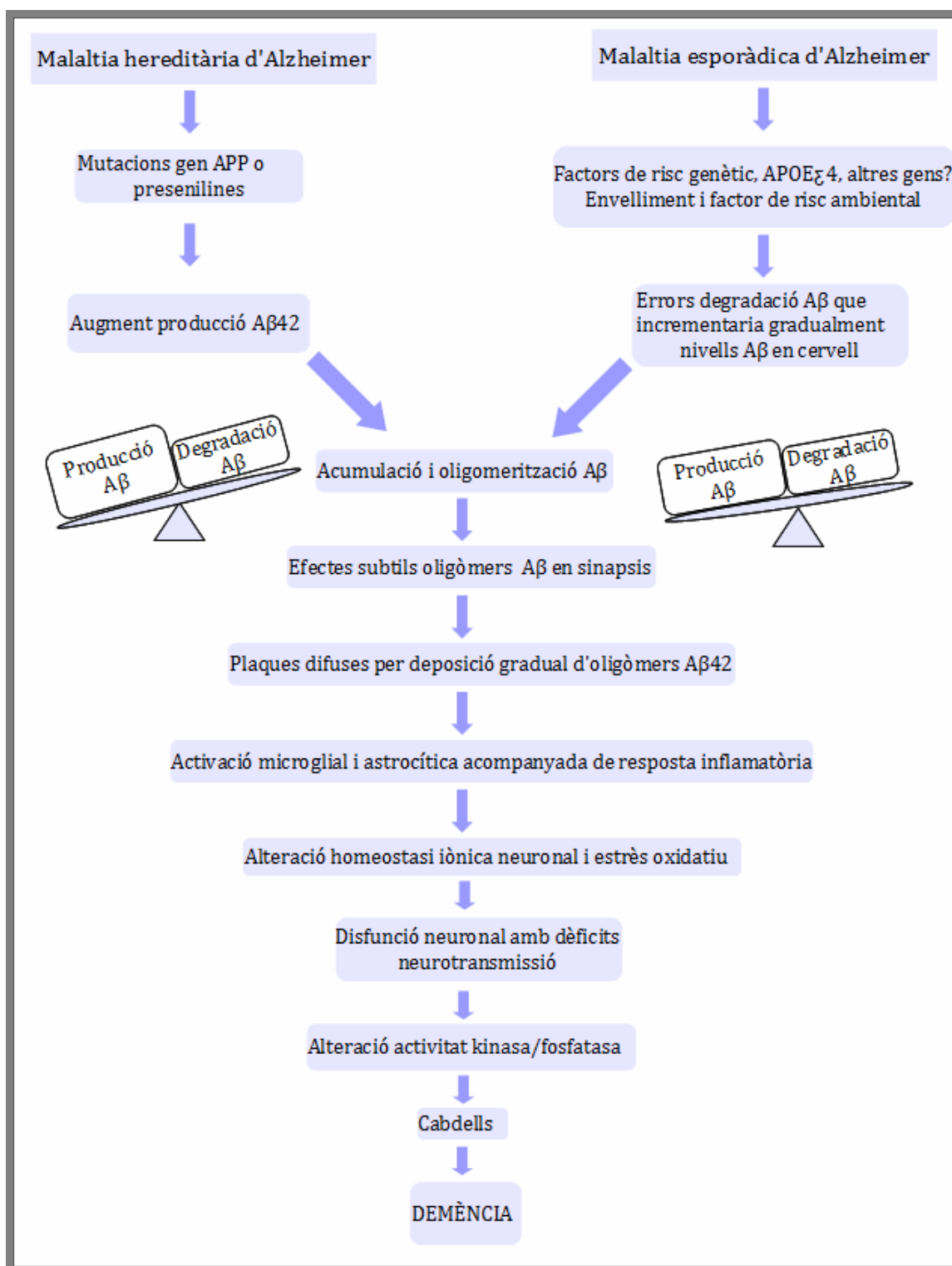


Figura 7: Esquema hipòtesi cascada beta amiloide. Adaptat de Kaj Blennow i col·ls., (2006).

## *Introducció*

apunten a l'alumini en l'etiologia de l'AD com és la seva presència en les plaques senils (Beauchemin i Kisilevsky, 1998; Collingwood i col·ls., 2008; Yumoto i col·ls., 2009) i en els cabdells neurofibrilars (Shin i col·ls., 1995; Murayama i col·ls., 1999), tots dos signes anatomopatològics característics de la malaltia. Així mateix s'ha trobat Al en els nuclis de les cèl·lules hipocampals (Yumoto i col·ls., 1996; Walton, 2006).

Malgrat que els estudis epidemiològics que avaluen la relació entre l'exposició a l'Al (contingut en aliments, fàrmacs, cosmètics i ocupacional) i l'AD continuen sent escassos, en un estudi realitzat per Rogers i col·laboradors (1999) van comprovar que en pacients amb AD el consum d'aliments que contenen grans quantitats d'additius d'Al era més elevat que en els subjectes control. En aquest sentit, s'han dut a terme estudis epidemiològics en diferents països (Noruega, Canadà, Anglaterra, Suïssa i França) amb la finalitat d'establir la relació entre consum d'aigua potable i la malaltia d'Alzheimer. Els resultats són controvertits ja que alguns d'ells troben una relació positiva entre els dos factors (Rondeau i col·ls., 2000; Rondeau i col·ls., 2009), i d'altres no (Martyn i col·ls., 1997; Gauthier i col·ls., 2000). És interessant assenyalar que aquests estudis obvien altres fonts d'exposició a l'Al, com per exemple la ingesta mitjançant els aliments (que representa la via principal d'exposició a l'Al, al voltant del 95%).

Així mateix, els resultats dels treballs experimentals fets fins ara en rosegadors per determinar el paper de l'alumini en l'etiologia de la malaltia d'Alzheimer són controvertits (Krewski i col·ls., 2007). En aquest sentit, cal tenir present que els rosegadors són resistent a patir processos neurodegeneratius (Golub i col·ls., 2000; Roig i col·ls., 2006). Per aquest motiu considerem molt important utilitzar animals amb susceptibilitat genètica a desenvolupar neuropatologia per tal d'esclarir aquesta relació.

### **1.2.4 Models animals de malaltia d'Alzheimer**

En la investigació de les malalties on es produeix una neurodegeneració ha resultat fonamental la introducció de diferents models experimentals. Tot i que en micos, gossos i gats d'edat avançada es poden observar canvis neuropatològics com cabdells i plaques senils

semblants als trobats a l'AD humana, cap d'ells s'ha utilitzat com un model per a l'estudi de l'AD de forma habitual (Manzano i col·ls., 2009). L'autèntic punt de partida en la investigació amb models experimentals procedeix de la introducció de models de ratolins transgènics (Sarasa, 2006). La creació d'animals transgènics suposa un gran avantatge perquè permet disposar de models murins de baix cost i fàcilment reproduïbles per a la investigació de la malaltia d'Alzheimer. Els animals transgènics són generalment ratolins, rates o cobais als quals, en les primeres fases de l'embrió, se'ls introdueix mitjançant injecció intranuclear un gen o part d'un gen d'una altra espècie juntament amb una seqüència promotora de l'expressió d'aquest gen. En el cas de la malaltia d'Alzheimer, s'han construït diferents transgènics amb mutacions en els gens de l'APP humana, les presenilines, la proteïna tau o de la apolipoproteïna E que reproduïxen signes de l'AD. A més, mitjançant creuaments entre animals transgènics poden produir-se animals doblement transgènics, per exemple, amb mutacions per l'APP i les presenilines.

Malgrat els beneficis que comporta la tecnologia genètica, és important assenyalar que fins al moment no s'ha pogut generar cap model experimental de ratolí que reculli tots els aspectes de l'AD. És precisament aquest fet el que revela les limitacions d'utilitzar un model animal per reproduir una malaltia humana que es desenvolupa durant dècades i implica alteracions de funcions mentals superiors. Ara bé, existeixen línies de ratolins transgènics que reproduïxen algunes característiques anatomopatològiques (plaques senils, cabdells neurofibrilars i/o pèrdua neuronal) així com dèficits cognitius semblants als trobats en l'AD (Taula 6).



## Introducció

Línia ratolí	Gen	Promotor	Característiques
PDAPP	APP770 humà amb mutació V717F	PDGF- $\beta$	Dipòsits amiloide 6-9 mesos. No pèrdua neuronal. No cabdells neurofibrilars.
Tg2576	Isoforma humana APP695 amb doble mutació K670N, M671L (hAPP <sub>Sw</sub> )	Prió hámster	A $\beta$ elevada als 3 mesos. Dipòsits amiloide 9-12 mesos. No pèrdua neuronal. No cabdells neurofibrilars.
APP23	Isoforma humana APP695 amb doble mutació K670N, M671L (hAPP <sub>Sw</sub> )	Murí Thy 1	Plaques A $\beta$ 6 mesos. Neurodegeneració Hiperfosforilació tau. No cabdells neurofibrilars.
PS1	Presenilina humana amb mutació M146L o M146V	PDGF- $\beta$	A $\beta$ endògena incrementada
APP $\times$ PS1	APP <sub>Sw</sub> humana/ratolí amb doble mutació K595N, M596L PS 1 humana amb mutació A246E	No descrit	Ratio A $\beta$ 1-40 i A $\beta$ 1-42 elevada in vitro Generen més ràpidament dipòsits d'amiloide que els que tenen un sol gen modificat
PSAPP	Isofor. humana APP695 amb doble mutació K670N, M671L (hAPP <sub>Sw</sub> ). PS1 humana amb mutació M146L o V	PDGF- $\beta$ Prió hámster	Increment A $\beta$ 1-42/43. Dipòsits fibrilars d'A $\beta$ en escorça cerebral i hipocamp
Tau	Tau humana isoforma curta (T44)	Prió ratolí	Inclusions argirofíl·liques als 12 mesos d'edat Degeneració axonal. Gliosis medul·la espinal i debilitat motora
JNPL3	Tau humana 4-repetida amb mutació en P301L	Prió ratolí	Pre-cabdells tau-immunoreactius associats amb degeneració neuronal en la medul·la espinal
PDAPP $\times$ ApoE	APP770 humana amb mutació V717F	PDGF- $\beta$	Canvis en distribució i característiques dels dipòsits d'amiloide que implicarien a la ApoE en la maduració de les plaques amiloidees
3 $\times$ TgAD	Isofor. hum. APP695 amb doble mutació K670N, M671L (hAPP <sub>Sw</sub> ), en tau humana P301 i Knock in per PS1 humana M146V	Murí Thy 1.2	Presència plaques 6 mesos i de cabdells als 12 mesos Disfunció sinàptica Dèficits potenciació a llarg termini
Tg CRND8	Isofor. humana APP695 amb doble mutació K670N, M671L (hAPP <sub>Sw</sub> ) i mutació de V717F	Prió hámster	Desenvolupa plaques i dèficits cognitius als 3 mesos
Tau301s	Isofor. 383 aa tau humana amb mutació P301S	Murí Thy 1	Patologia neurofibrilar generalitzada en cervell i medul·la espinal. Pèrdua neuronal en medul·la espinal

Taula 6: Models animals transgènics de la malaltia d'Alzheimer. Informació extreta de Duff i Suleman, (2004); Manzano i col·ls, (2009) i Elder i col·ls, (2010).

Dintre dels models de ratolins transgènics generats d'AD un dels més utilitzats és el Tg2576. Aquesta línia de ratolins sobreexpressa l'APP i conté la doble mutació KM670/671NL present en una família sueca afectada per la malaltia. Aquests animals desenvolupen amb l'edat dèficits en l'aprenentatge i memòria associats a l'aparició de plaques d'amiloide en àrees límbiques i corticals clarament identificables al voltant de l'any d'edat (Hsiao i col·ls., 1996). Aquestes plaques van acompanyades d'una resposta astrocítica i microglial, així com de fenòmens d'estrès oxidatiu (expressió augmentada d'enzims antioxidants com són l'hemoxygenasa o la superòxid dismutasa 1 (SOD1)) (Crouch i col·ls., 2008).

### 1.2.5 Model per l'estudi de l'aprenentatge i la memòria

L'aprenentatge i la memòria espacial es relacionen amb la capacitat d'adquirir i retenir associacions de les característiques de l'ambient que permeten a l'organisme moure's en l'espai (Vicens i col·ls., 2003), és a dir, consisteix en múltiples mecanismes especialitzats en codificar, emmagatzemar i recuperar informació sobre rutes, configuracions i localitzacions espacials (Kessels i col·ls., 2001). Aquesta memòria pot ser avaluada mitjançant models animals en els quals la solució de la tasca depèn de la informació espacial disponible. Amb aquest propòsit fa més de 30 anys que va ser descrit un aparell per investigar l'aprenentatge espacial i la memòria en rates, el laberint aquàtic de Morris (Morris, 1984).

L'aparell consisteix en una piscina amb aigua en la qual es troba submergida una plataforma no visible que els animals aprenen a localitzar mitjançant la realització de diversos assajos (Figura 8). Un dels motius del seu èxit és precisament la seva simplicitat, encara que el procediment pot ser modificat per avaluar altres tipus de memòria així com per estudiar les seves bases neurobiològiques o l'aplicació de diferents tractaments farmacològics (D'Hooge i De Deyn, 2001).

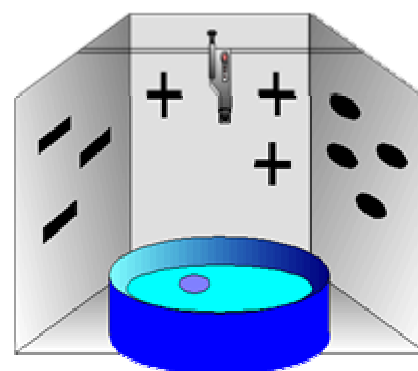


Figura 8: Laberint aquàtic de Morris.  
Imatge cedida per M. Teresa Colomina i Manel Santafé.

Les variacions metodològiques realitzades per diferents grups d'investigació a la tasca del laberint aquàtic han permès comprovar que el rendiment en la tasca depèn de les

## *Introducció*

característiques dels animals experimentals, de l'aparell i del protocol utilitzats, entre d'altres. Factors com el pes, el desenvolupament físic i l'edat poden influir en la velocitat dels animals al nedar (Wenk, 2004). El gènere, l'espècie o soca utilitzada, així com l'estrès, possibles malalties, la desnutrició o l'edat dels animals també poden influir en els resultats (D'Hooge i De Deyn, 2001). Igualment, es poden trobar diferències depenent de les claus visuals emprades, la utilització o no d'aigua opaca, les mides de la piscina o el protocol que es fa servir (número d'assajos en l'adquisició, durada dels mateixos, interval entre assajos, temperatura de l'aigua etc.).

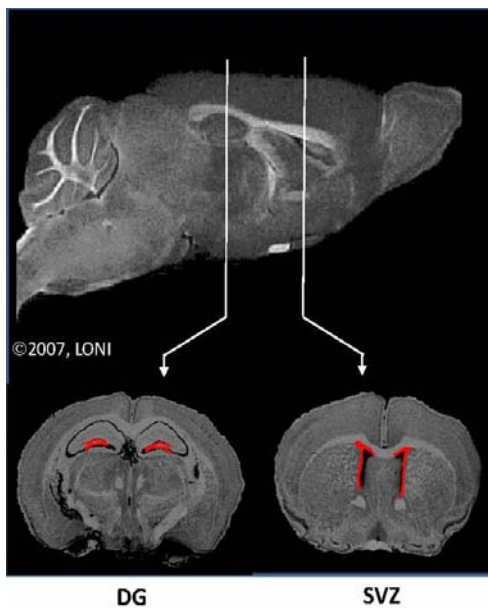
Els rosegadors poden adoptar quatre formes principals de navegació per a la resolució de tasques espacials: orientació, guia, cartogràfica i d'integració de la ruta (Santin i col·ls., 2000). En l'aprenentatge d'orientació els animals basen la seva cerca en moviments apresos durant l'execució de la tasca; en l'aprenentatge de guia aprenen associacions entre els estímuls senyal i la meta. Aquestes dues formes de navegació s'explicarien mitjançant paradigmes associatius de condicionament. L'aprenentatge cartogràfic, en canvi, implica la utilització de senyals distals amb les quals els animals formen una representació del seu entorn (mapa cognitiu) mitjançant el que localitzen la meta. Per últim, la integració de la ruta consisteix en un procés d'actualització de la informació quan les pistes ambientals no n'ofereixen la suficient, mitjançant un sistema intern de referència basat en el lloc de sortida abans d'iniciar la navegació, utilitzant principalment pistes cinestèsiques i senyals vestibulars (Santin i col·ls., 2000). Les diferents estratègies s'han relacionat amb diferents estructures cerebrals. Si els animals utilitzen una estratègia de tipus guia, l'estructura cerebral involucrada en aquest tipus d'aprenentatge és l'escorça parietal, implicada en el processament dels senyals pròxims (Save i Poucet, 2000; Rogers i Kesner, 2006), mentre que quan utilitzen una estratègia cartogràfica, l'estructura implicada és l'hipocamp. Tanmateix, la participació d'altres regions cerebrals en la navegació espacial involucra un gran nombre de regions i vies a més de les originàriament proposades: estructures talàmiques, amígdala, locus coeruleus, nucli del rafe i accumbens, fimbria i fòrnix, estriat, cervell anterior, cerebel i neocòrtex (Cain i Saucier, 1996). A més, s'han descrit canvis moleculars i estructurals a l'hipocamp en relació als processos de la formació de la memòria (Morgado-Bernal, 2011).

## 1.3 Neurogènesi

La neurogènesi és el procés de generació de noves cèl·lules nervioses. El descobriment de neurogènesi en cervells adults va replantejar el dogma mantingut en neurociències sobre la impossibilitat de producció de noves cèl·lules nervioses després dels estadis embrionaris, i per tant de regeneració en el sistema nerviós central.

Encara que a principis del segle XX es va apuntar l'existència de divisió cel·lular en el sistema nerviós central en un estadi postnatal (Hamilton, 1901; Allen, 1912), les limitacions metodològiques no van permetre provar aquest fet. Al llarg dels anys 60, Joseph Altman i col·laboradors (1965) van poder demostrar el naixement de noves cèl·lules en el gir dentat de l'hipocamp, en la neoescorça (Altman i Das, 1966) i en el bulb olfactori (Altman, 1969) en cervells de rates adultes utilitzant la tècnica d'autoradiografia. El fonament d'aquesta tècnica és marcar amb timidina tritiada (timidina-<sup>3</sup>H), cèl·lules que es troben en fase mitòtica (fase S), ja que la substitueix i s'incorpora a l'ADN, i es pot detectar mitjançant autoradiografia. Aquests resultats, però, no van ser considerats per la comunitat científica, fins que a la dècada dels 90 diversos grups van reforçar les investigacions amb les quals es va demostrar que la neurogènesi persisteix tant en mamífers superiors com en primats i humans (Eriksson i col·ls., 1998; Gould i col·ls., 1999). Com afirmen Ming i Song (2005) podríem definir la neurogènesi com: "el procés de generació de neurones funcionals des de cèl·lules mare, que inclou proliferació i diferenciació neuronal dels progenitors neurals i la maduració i integració funcional de la cèl·lula nascuda dintre dels circuits neuronals". Aquest procés s'inicia amb la determinació del tipus de divisió que pateix una cèl·lula precursora o cèl·lula mare, que pot ser simètrica si es produeixen dues cèl·lules filles idèntiques, o asimètriques, si les filles tenen potencial diferent. Després d'una divisió asimètrica, diversos factors, en la seva majoria desconeguts, determinen la seva diferenciació en un tipus cel·lular concret (neurona o cèl·lula de la glia).

## Introducció



**DG** **SVZ**  
*Figura 9: Zones neurogèniques en cervells adults.*

En el cervell adult dels mamífers la neurogènesi es produeix principalment en dues àrees cerebrals: en la zona subventricular del bulb olfatori i en el gir dentat de l'hipocamp (Figura 9). Aquestes neurones deriven de les cèl·lules mare residents en la zona subventricular dels ventricles laterals i en la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp, respectivament (Taupin i Gage, 2002). La neurogènesi hipocampal en cervells adults ha estat demostrada en aus (Barnea i Nottebohm, 1994), rèptils (Lopez-Garcia, 1993), rosegadors (Altman i Das, 1965), i primats, incloent als humans (Eriksson i col·ls., 1998; Gould i col·ls., 1999).

Les cèl·lules precursors es troben agrupades en nius germinatius formats de les pròpies cèl·lules precursors (cèl·lules mare o progenitores), astròcits, cèl·lules endotelials, microglia, macròfags, i la matriu extracel·lular (Kempermann i col·ls., 2006). Les cèl·lules mare es caracteritzen per la seva capacitat d'autorenovació il·limitada i de ser multipotents, és a dir, de diferenciar-se en almenys dos tipus cel·lulars diferents. En la zona subventricular, les cèl·lules mare donen lloc a les progenitores que migraran mitjançant la cadena rostro-migratòria per arribar al bulb olfatori on es diferencien per formar interneurons inhibidòries funcionals de dos tipus: cèl·lules granulars i periglomerulars, que estableixen contactes per modular el processament de la informació sensorial (Lois i Alvarez-Buylla, 1994). En el gir dentat, les cèl·lules mare resideixen en la zona subgranular (ZSG) i originen les cèl·lules progenitores. Aquestes maduren localment en la zona granular enviant les seves projeccions axonals cap a l'àrea coneguda com banya d'Amón (CA3) i les arboritzacions dendrítiques cap a la capa granular de l'hipocamp (Arias-Carrión i col·ls., 2007).

## **Etales i caracterització morfològica dels diferents tipus cel·lulars**

El procés neurogènic comprèn diferents etapes: un primer estadi en què les cèl·lules proliferen, un segon estadi en el qual aquestes sobreviuen i es comencen a diferenciar i un

últim estadi de maduració on es diferencien com a neurona o cèl·lula glial i estableixen contactes sinàptics.

En el nivell de proliferació cel·lular la cascada s'origina en cèl·lules radials de la glia (cèl·lules tipus 1), ubicades en la ZSG (entre la capa de cèl·lules granulars i l'hilus o CA4) que originen cèl·lules glials i neurones en la capa granular del gir dentat (Arias-Carrión i col·ls., 2007). Aquesta regió està àmpliament vascularitzada, fet que corrobora la relació espacial trobada entre els vasos sanguinis i la divisió de cèl·lules precursors (Palmer i col·ls., 2000).

Presumiblement la major part de cèl·lules mare d'aquest sistema són d'aquest tipus. Aquestes donen lloc a cèl·lules altament proliferatives (cèl·lules tipus 2) que poden dividir-se en cèl·lules glials (tipus 2a) i en neuronals (tipus 2b). Finalment, una posterior cèl·lula precursora (tipus 3) marca la sortida del cicle cel·lular (Figura 10). En un interval postmitòtic breu, durant el que les noves cèl·lules expressen calretinina (proteïna lligadora de calci), les noves neurones estenen els seus axons a l'àrea CA3. La maduració morfològica troba la seva expressió més visible en l'extensió de les dendrites i en l'aparició de les espines dendrítiques. L'input GABAèrgic que es produeix des del principi fins a la fase sinàptica promou la maduració neuronal fins que s'inicia l'entrada regular glutamatèrgica des de l'escorça entorrinal (Figura 11). Encara que es coneix poc sobre els detalls de la maduració neuronal, sembla que, en aproximadament set setmanes, les noves neurones no es distingeixen de les neurones velles que les envolten. Un nombre de factors de transcripció ha estat vinculat a estats particulars del desenvolupament neuronal en l'hipocamp adult, per exemple, el factor específic de cèl·lula granular Prox1, que és expressat aviat en el nivell de cèl·lules progenitores tipus 2 i que es continua expressant en cèl·lules granulars madures.

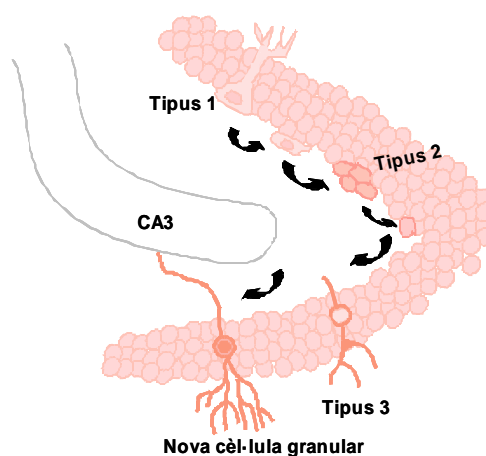


Figura 10: Neurogènesi en la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp.

## Introducció

Entre l'etapa de proliferació cel·lular i poc després que acabi el cicle cel·lular es produeixen grans canvis en el nombre de cèl·lules. En rates adultes joves s'estima que es generen aproximadament unes 250000 cèl·lules cada mes, és a dir, un 6% de la població total de cèl·lules granulars, però només algunes de les noves cèl·lules s'integren de forma estable a la xarxa neuronal (Cameron i McKay, 2001).

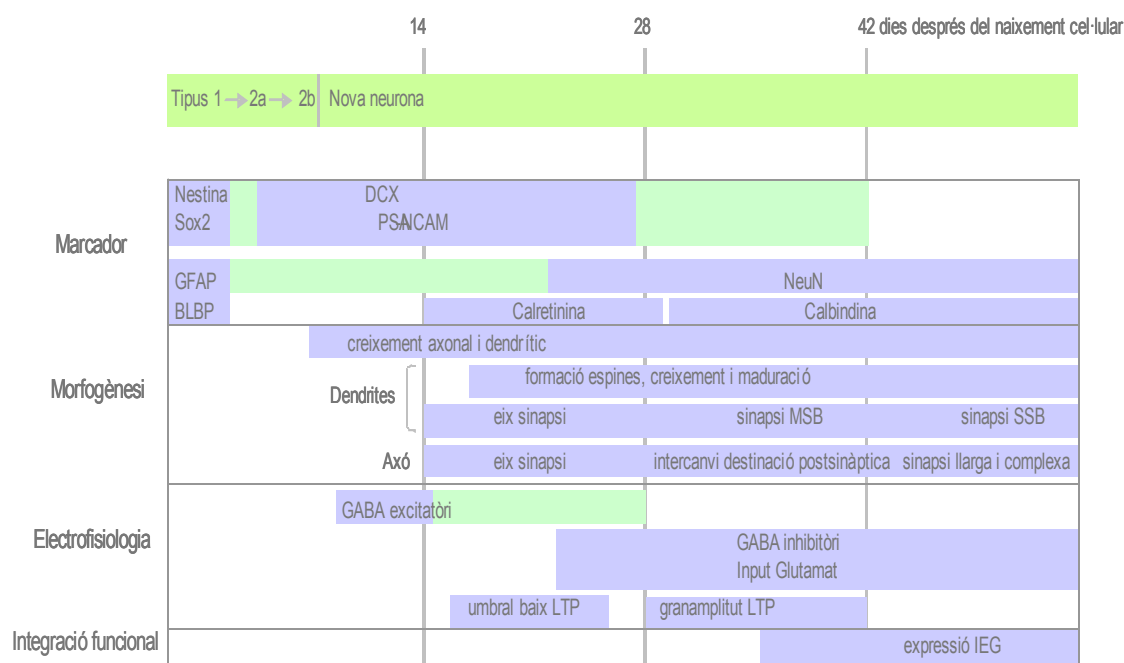


Figura 11: Caracterització del procés neurogènic en la zona subgranular del gir dentat de l'hipocamp. Adaptat de Zhao i col·ls, (2008).

### 1.3.1 Funcionalitat de les noves neurones

Diferents treballs suggereixen que les noves neurones estarien principalment involucrades amb determinades funcions cerebrals relacionades amb l'olfacte i l'aprenentatge i la memòria hipocamp-dependent. És important tenir en compte que l'hipocamp és una estructura cerebral relacionada amb les emocions i, fonamentalment, amb els processos d'aprenentatge i memòria espacial (Bannerman i col·ls., 2004).

Molts factors genètics i ambientals que afecten la neurogènesi a l'hipocamp provoquen canvis en l'execució cognitiva. Per exemple, s'han demostrat correlacions directes entre la

neurogènesi i l'execució en tasques de memòria espacial utilitzant diverses soques d'animals (Kempermann i Gage, 2002). Igualment, altres treballs han estudiat els efectes de l'ambient enriquit sobre la neurogènesi i l'aprenentatge (Olson i col·ls., 2006; Kee i col·ls., 2007; Tashiro i col·ls., 2007). Altres factors com ara les manipulacions genètiques, l'edat, o l'estrès també afecten tots dos processos (Zhang i col·ls., 2008; Bizon i Gallagher, 2005; Lemaire i col·ls., 2000).

La regulació de la neurogènesi per l'activitat neural suggereix que l'aprenentatge podria induir l'activació de les noves neurones nascudes i conseqüentment augmentar la seva supervivència i incorporació dintre dels circuits existents. Tot i això, aquesta regulació és complexa (Zhao i col·ls., 2008). De fet, la neurogènesi només és augmentada per algunes tasques d'aprenentatge hipocamp-depenents (Shors i col·ls., 2002; Meshi i col·ls., 2006).

S'ha descrit que les noves neurones madures són reclutades en l'hipocamp per ser ensamblades en els circuits neurals i que poden desenvolupar un paper especial per a l'estabilització dels canvis sinàptics necessaris per a la consolidació de la memòria (Ramirez-Amaya i col·ls., 2006). Tanmateix, el paper de la neurogènesi en l'aprenentatge i la memòria roman encara sense entendre's totalment. Una hipòtesi al respecte defensa que les noves neurones generades tindrien un paper important com a mediadores en la plasticitat estructural i funcional del SNC, ja que aquestes exhibeixen propietats fisiològiques específiques en cada etapa del seu procés de maduració. Estudis recents mostren que les noves neurones presenten diferents propietats d'activitat i passivitat en comparació amb les neurones madures. De fet, les noves neurones presenten un llindar més baix per a la inducció de potenciació o depressió a llarg termini (*long-term potentiation/ depression* (LTP/LTD)) i presenten amplituds més grans de LTP (Wang i col·ls., 2000; Schmidt-Hieber i col·ls., 2004).

Kozorovitskiy i Gould (2003) descriuen la producció de noves neurones en resposta a danys sota tres tipus de circumstàncies:

- 1.- El dany en una zona on normalment es produeix neurogènesi provoca un increment local en l'índex de producció neuronal.



## *Introducció*

2.- El dany en una àrea on no es registra normalment neurogènesi provoca un increment en l'índex de producció neuronal en una altra àrea no afectada, en la qual normalment sí es registra neurogènesi en edats adultes.

3.- El dany en una població neuronal on normalment no es registra neurogènesi produeix l'inici d'aquest procés.

Aquestes dades indiquen que en determinades situacions la neurogènesi podria ser conseqüència d'un mecanisme compensatori del sistema. De fet, en condicions patològiques com la isquèmia, l'epilèpsia i el trauma s'ha demostrat un augment en l'activitat neural de les cèl·lules progenitores en la zona subventricular i en el gir dentat (Kuhn i col·ls., 2001).

### **1.3.2 Factors moduladors de la neurogènesi**

La neurogènesi no és un esdeveniment estàtic, sinó dinàmic i, per tant, està modulats i regulats per diversos factors. Entre els factors involucrats en la modulació i la regulació de la neurogènesi es troben tant factors intrínsecs (genètics i moleculars), com extrínsecs (activitat física, aprenentatge, estrès, etc.) (Taula 6).

Durant el desenvolupament un gran nombre de gens proneurals (de la família bHLH) regulen la determinació i diferenciació cel·lular de les cèl·lules progenitores (Kintner, 2002). Alguns d'aquests gens s'expressen en diferent grau en les regions germinatives del cervell adult com a resposta a estímuls o lesions en aquestes zones. Així, per tal que es produeixi la neurogènesi en el cervell adult, de la mateixa manera que en un cervell en desenvolupament, es requereixen diversos factors cel·lulars com són els gens proneurals, les proteïnes amb homodominis i altres senyals encara no identificats (Hallbergson i col·ls., 2003). Entre els gens que regulen la neurogènesi i morfogènesi tant en estadis embrionaris com en adults trobem l'expressió dels gens Notch, BMP, Eph/ephrins, Noggin i Shh (Alvarez-Buylla i Lim, 2004).

Algunes troballes indiquen que els neurotransmissors i els factors de creixement modulen també la neurogènesi en adults. Per exemple, l'administració crònica d'antidepressius que augmenten la serotonina incrementen també la neurogènesi (Ming i

Song, 2005). També els factors de creixement com ara el *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) i l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1) incrementarien la proliferació (Ming i Song, 2005).

Els factors ambientals modulen la producció i supervivència de les noves neurones. Viure en ambients enriquits incrementa la proliferació, independentment de l'edat dels ratolins tot i que no sabem si per l'augment en l'activitat física o cognitiva (Abrous i col·ls., 2005). L'estrès és un altre factor ambiental que clarament ha demostrat afectar els processos de neurogènesi. L'elevació dels nivells de glucocorticoides per l'activació de l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal és el principal mecanisme pel qual l'estrès produeix la supressió de proliferació cel·lular en el gir dentat (Mirescu i Gould, 2006).

### 1.3.3 Neurogènesi i malaltia d'Alzheimer

La modificació dels processos de neurogènesi en la malaltia d'Alzheimer és controvertida. Per una banda, diversos models animals de malaltia d'Alzheimer han descrit un decrement de neurogènesi a l'hipocamp (Feng i col·ls., 2001; Haughey i col·ls., 2002; Wen i col·ls., 2002; Dong i col·ls., 2004; Wang i col·ls., 2004; Donovan i col·ls., 2006), mentre que d'altres autors, mostren un augment de la mateixa en cervells post-mortem de malalts d'Alzheimer (Jin i col·ls., 2004b; Yu i col·ls., 2009) i en un model animal d'AD (PDGF-APP<sub>Sw, Ind</sub>) (Jin i col·ls., 2004a). Un altre aspecte que ha estat explorat en la malaltia d'Alzheimer és la influència de l'ambient enriquit sobre la formació de neurones noves. Així, es va trobar que rosegadors transgènics mantinguts en un ambient enriquit presentaven un augment en els nivells de neurotrofina 3 (NT-3) i en el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF). Aquest augment anava acompanyat per una millora en l'aprenentatge del laberint aquàtic (Wolf i col·ls., 2006). La mutació en la proteïna precursora d'amiloide pot interferir directament en la proliferació i maduració cel·lular (Mattson, 1997), o indirectament mitjançant la producció d'A $\beta$  1-42, pèptid que ha mostrat tenir efectes negatius en la supervivència cel·lular tant in vitro com in vivo (Koh i col·ls., 1990). Lazarov i col·laboradors (2005) van reportar que l'ambient enriquit indueix una disminució en els nivells de la proteïna beta amiloide i genera

## Introducció

Factors reguladors		Prolif.		Superv.		Diferen.		Mecanismes	
		ZSV	ZSG	ZSV	ZSG	ZSG	ZSV		
	<i>Soca ratolins</i>		+/-		+/-		+/-		
	<i>Sexe</i>	=	+/-	=	=	=	=		
	<i>Edat</i>	-	-		=		-	EGFR / Corticosteroids	
<i>Hormones</i>	Estrogen	=	+		=		=		
	Oestrogen		+					Serotonina	
	Embaràs	+	=					Prolactina	
	Testosterona				+				
<i>Neurotransmissors</i>	Dopamina	-	-		=		=	Receptors D2L	
	Serotonina	+	+						
	Acetilcolina	-	=	-	+		=		
	Glutamat	-			=			mGluR, NMDAR	
	Norepinefrina	=	+		=		=	PAC1 i PKC	
	GABA		-		-		-	Serotonina/ Cannabinoides	
	Òxid nítric	-	-/=	=			+/=	=	
	Cannabinoides		+					=	
	<i>Factors de creixement</i>	FGF-2	+	=					
		EGF	+	=					
IGF-1			+		+		+		
BDNF		+							
<i>Conducta</i>	Ambient enriquit	=	+/=	=	+/=	=	+/=	VEGF	
	Exposició olor	=	=	+	=				
	Activitat física	=	+	=	+			VEGF	
	Aprenentatge	Laberint aquàtic		=		+/=		=	
Reflex palpebral			=		+				
Restricció dietètica			=		+			BDNF, NT-3	
Estrès			-		-			Glucocorticoids	
<i>Drogues</i>	Antidepressius		+		+		+	Serotonina	
	Liti		+				=		
<i>Patologies</i>	Isquèmia	+	+/-		+	+	+	NMDAR, CREB	
	Epilèpsia	+	+/-		+/-		+/=		
	Inflamació	+/-	-		-		-	IL-6, TNF $\alpha$	
	Diabetis		-		-				

Taula 7: Factors que influeixen en la neurogènesi (proliferació, supervivència i diferenciació) de la zona subventricular i subgranular. Adaptat de Ming i Song (2005).

un augment en l'expressió dels gens associats amb l'aprenentatge i la memòria, així com en els gens associats amb la formació de neurones noves i amb el procés de supervivència cel·lular.

Tenint en compte que l'acetilcolina és requerida per a la proliferació de precursors neuronals, no seria estrany que la pèrdua d'inputs colinèrgics en el cervell anterior observats en l'AD produeixi un descens de la neurogènesi en el gir dentat (Winkler i col·ls., 1998), efecte observat en rates, juntament amb l'afectació de la memòria espacial en la tasca del laberint aquàtic de Morris (Mohapel i col·ls., 2005).

Un altre factor que influencia beneficiosament la neurogènesi en models animals d'AD és la restricció dietètica que produeix un augment de la mateixa associat amb l'increment de BDNF (Lee i col·ls., 2000; 2002).

La disminució de factors de creixement (FGF-2, IGF-1, VEGF) podria induir un decrement de la neurogènesi en la zona subgranular. De fet, una alteració dels nivells d'IGF-1 ha estat observada en l'AD (Carro i Torres-Aleman, 2004). Tanmateix, en estudis post-mortem de pacients amb AD s'ha registrat immunoreactivitat augmentada pel factor de creixement endotelial vascular (VEGF) (Kalaria i col·ls., 1998) i augment dels nivells de VEGF en sang (Tarkowski i col·ls., 2002). L'augment de la VEGF podria reflectir un mecanisme de reparació compensatori, així com també podria contribuir als canvis observats en la neurogènesi en individus amb AD. Malgrat aquests indicis, és necessària més recerca per poder establir la contribució exacta d'aquests factors en la patologia hipocampal reportada en l'AD.



## ***II. HIPÒTESI I OBJECTIUS***



## HIPÒTESI

La malaltia d'Alzheimer presenta dos signes anatomopatològics característics a nivell cerebral: extracel·lularment les plaques neurítiques i intracel·lularment els cabdells neurofibrilars. Tots dos presenten una acumulació important d'Al. Una de les teories més acceptades per explicar l'etiologia de l'AD és la hipòtesi de la cascada beta amiloide. Aquesta apunta que l'acumulació de proteïna beta amiloide desencadenaria una cascada de successos que finalitzaria amb la mort cel·lular. Per altra banda, el naixement de noves cèl·lules en el gir dentat de l'hipocamp és susceptible de modificacions per l'edat i altres factors.

En aquest sentit, pensem que l'exposició a l'Al augmentarà els nivells de proteïna  $\beta$ -amiloide i alterarà els processos de neurogènesi, produint-se afectació tant a nivell conductual com cognitiu. Aquesta afectació serà més evident en la població de ratolins amb vulnerabilitat genètica per desenvolupar l'AD, especialment quan el temps i la dosi de tractament augmentin.

## OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general de la present tesi doctoral és avaluar les possibles interaccions entre factors genètics i ambientals sobre la conducta i els processos de neurogènesi en un model animal d'AD (APPSWE (Tg2576)).

## OBJECTIUS ESPECÍFICS

L'anterior objectiu general es concreta en els següents objectius:

1. Valorar els efectes de l'exposició oral a 1 mg de lactat d'Al/g de la dieta durant 3 mesos sobre l'activitat motora, l'ansietat i els processos d'aprenentatge espacial així com en els nivells de proteïna beta amiloide i neurogènesi en ratolins Tg2576.
2. Valorar els efectes de l'exposició oral a 11 mg de lactat d'Al/g de la dieta durant 6 mesos sobre l'activitat motora, l'ansietat i els processos d'aprenentatge espacial així com en els nivells de proteïna beta amiloide i neurogènesi en ratolins Tg2576.



### *Hipòtesi i Objectius*

3. Valorar els efectes de l'exposició oral a 11 mg de lactat d'Al/g de la dieta durant 9 mesos sobre l'activitat motora, l'ansietat i els processos d'aprenentatge espacial, així com en els nivells de proteïna beta amiloide i neurogènesi en ratolins Tg2576.

### ***III. MATERIALS I MÈTODES***



### 3.1 Animals i tractament

En les diferents fases experimentals vam utilitzar ratolins mascles transgènics (Tg2576) i els seus corresponents controls no transgènics (*Wild type*). Com ja s'ha comentat, els ratolins Tg2576 sobreexpressen l'APP humana 695, que conté la doble mutació (K670N i M671L) i presenten deteriorament cognitiu (Hsiao i col·ls., 1996) per aquesta raó són considerats un model d'AD.

Els animals eren disposats individualment en gàbies de plàstic. La sala on habitaven es mantenia a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  amb una humitat relativa de  $50 \pm 10\%$ . El període de llum/foscor era de 12 h, estant il·luminada de 08.00-20.00h. Als animals se'ls permetia l'accés a l'aigua i al menjar (Harlan, Barcelona, Espanya) "*ad libitum*" fins als 5 mesos d'edat. A partir d'aquesta edat els animals començaven a ser tractats amb la dieta normal o amb la que portava el suplement. Els ratolins dels grups corresponents foren tractats amb 0, 1 o 11 mg/g de lactat d'Al subministrat mitjançant el pinso de la seva dieta, que correspon a 0, 0.11 i 1.11 mg d'Al per g de pinso. Aquestes dosis han estat escollides segons estudis previs fets d'altres autors (Golub i col·ls., 2000) que han treballat amb la dosi d'1.11 mg d'Al per g de dieta. Les dosis utilitzades per nosaltres considerant un consum d'uns 3 g de pinso diaris per ratolins d'un pes aproximat de 30 g suposen per la dosi baixa un consum de 0,33 mg d'Al per ratolí i per la dosi alta de 3,33 mg d'Al. Tenint en compte aquestes dosis, en el cas de l'exposició humana la quantitat total que consumiria un subjecte de 70 kg seria de 770 o de 7700 mg d'Al per dia, per la dosi baixa i alta respectivament. Les dosis baixes podrien ser equiparables a les consumides per subjectes que prenen antiàcids que contenen Al, la dosi alta està per sobre del consum humà en factors de 10 a 100 vegades superior.

Els procediments relatius a la utilització dels animals i al protocol d'experimentació van ser aprovats pel Comitè Ètic de Cura i la utilització d'animals experimentals de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Espanya).

En la primera condició experimental els ratolins Tg2576 i els seus controls van ser subministrats per Taconic Europa (Lille Skensved, Dinamarca); en les altres dues disposant de l'autorització prèvia de Taconic Europa (Ejby, Dinamarca), els ratolins transgènics els

### *Materials i Mètodes*

obteníem per l'encreuament de ratolins mascles Tg2576 amb femelles C57BL6/SJL. Quan les cries tenien dos mesos d'edat i per tal de determinar el genotip vam realitzar l'anàlisi d'ADN mitjançant la *polymerase chain reaction* (PCR) utilitzant-ne un troç de cua com a mostra de teixit (Garcia i col·ls, 2010).

En la primera fase experimental els animals eren exposats durant 3 mesos a dosis baixes de lactat d'Al (1 mg/g); en la segona fase s'augmentava la dosi de lactat d'Al (11 mg/g) i el temps a 6 mesos. Finalment, en la tercera fase experimental els ratolins van ser exposats durant 9 mesos a una dosi d'Al elevada.

## **3.2 Proves conductuals i cognitives**

Tot i que les condicions utilitzades a cada fase experimental són detallades en els diferents articles, en aquest apartat es fa un resum de les proves conductuals i cognitives utilitzades en tots ells.

### **Bateria d'observació funcional**

La bateria d'observació funcional és un procediment no invasiu utilitzat en investigació que permet detectar i quantificar deficiències funcionals així com els efectes neurològics en el SNC de diferents substàncies. Amb aquest propòsit avalua l'activitat, la reactivitat sensoriomotora i les funcions neuromusculars i autonòmiques (Sills i col·ls., 2000). El protocol consistia a registrar l'activitat de l'animal en la seva gàbia durant un minut i posteriorment durant 30 seg s'avaluava l'activitat de l'animal a la mà i altres paràmetres com llagrima, salivació, etc. Finalment, els animals es col·locaven en un camp obert (60 cm × 90 cm × 30 cm) on s'avaluava la resposta al contacte, la resposta d'apropament i la resposta auditiva. A l'annex s'adjunten les fulles de registre on s'explica detalladament cada ítem i les seves condicions de puntuació.

## **Camp obert**

La prova del camp obert s'utilitza en rosegadors per avaluar els nivells d'activitat general, l'activitat locomotora i els hàbits d'exploració en un ambient nou. Aquesta prova suposa un conflicte entre la tendència natural del ratolí a explorar els nous ambients i la por que tenen als espais oberts. Per això, en el camp obert, podem diferenciar dues zones: la perifèria (la zona que compren 10 cm de la paret cap endins) i la zona centre (que compren la resta de camp). Aquestes dues zones ens permeten també avaluar conductes relacionades amb l'ansietat o la por en els ratolins (Fuentes i col·ls, 2007).

Els ratolins al començament de la prova són col·locats al centre del camp obert i se'ls deixa moure lliurement durant un temps determinat. Els moviments i trajectòries dels animals són gravats per una càmera de vídeo (model Sony CCD-IRIS) col·locada damunt del camp. El programa Etho-Vision © (Noldus Tecnologies de la Informació, Wageningen, The Netherlands) va ser utilitzat per analitzar la distància total recorreguda, el temps en cada àrea i el nombre de rearings (aixecaments sobre les dues potes posteriors).

## **Caixa de dos 2 compartiments**

Aquesta prova s'utilitza per avaluar ansietat. El paradigma en el qual es basa és el conflicte que genera al ratolí per una banda, l'aversion innata a les zones il·luminades i, per l'altra, l'activitat exploratòria espontània. Si en condicions normals es dona al ratolí a escollir entre un compartiment clar i il·luminat i un altre de fosc i sense il·luminació el ratolí prefereix el fosc. S'ha demostrat que substàncies ansiolítiques augmenten la durada total en el compartiment clar mentre que compostos ansiògens augmenten el temps en el compartiment fosc (Hascoët i Bourin, 2009).

L'aparell consistia en una caixa dividida en dos compartiments (50 cm x 25 cm x 27 cm), un obscur i l'altre clar i il·luminat. Els animals podien moure's lliurement entre els dos compartiments i travessar d'un compartiment a un altre per una porta petita (5 × 5 cm) ubicada al centre de la paret que divideix els dos compartiments. El ratolí a l'inici de la sessió era situat en el compartiment obscur i durant 5 minuts es registrava la latència d'entrada al

## *Materials i Mètodes*

compartiment clar, el temps total en el compartiment clar i en l'obscur i el nombre de vegades que l'animal passava d'un compartiment a l'altre.

### **Laberint aquàtic**

El laberint aquàtic de Morris (Morris 1984) és una prova que avalua la memòria espacial, considerada hipocamp-depenent. Les característiques dels animals experimentals, de l'aparell i del protocol utilitzat entre d'altres, determinen l'execució de la tasca. Per tal d'assegurar-nos que els ratolins realitzen un aprenentatge hipocamp-depenent és important proporcionar-li a l'animal claus visuals externes per tal que generi un mapa cognitiu que li permeti trobar la plataforma submergida a l'aigua, i eliminar possibles senyals proximals amb la utilització d'una paret mòbil a l'interior del laberint.

El laberint d'aigua consisteix en un tanc circular (d'1 m de diàmetre i una alçada de 60 cm) dividit en quatre quadrants imaginaris. Ubicada en el quadrant objectiu es troba submergida 1 cm sota l'aigua una plataforma. La tasca es divideix en una fase d'adquisició i en una de retenció. En els assajos que es realitzen en la fase d'adquisició els animals són col·locats a l'aigua mirant cap a la paret del laberint i des d'un punt de sortida diferent en cada assaig i se'l deixa buscar la plataforma durant 60 o 120 segons. Un cop ha trobat la plataforma (per ell mateix o amb l'ajuda de l'experimentador) se'l deixa allà entre 20 o 30 segons. Aquest procediment es repeteix en els diferents assajos i durant l'entrenament. En la retenció s'avalua el record de l'aprenentatge deixant-lo nedar lliurement durant 60 segons, havent tret la plataforma de la piscina. Tant l'adquisició com la retenció dels animals és registrada mitjançant una càmera de vídeo col·locada sobre el laberint, les dades van ser analitzades amb el programa Etho-Vision © (Noldus Technologies de la Informació, Wageningen, Els Països Baixos). En la fase d'adquisició es va analitzar el temps de latència fins trobar la plataforma, la distància recorreguda i la velocitat. En la fase de retenció els paràmetres avaluats van ser els mateixos, però en el quadrant objectiu. Així mateix, també es va comparar dintre de cada grup el temps, distància i velocitat en el quadrant objectiu respecte als altres quadrants.

### 3.3 Recollida i processament de les mostres

#### Administració Bromo-deoxiuridina i recollida de mostres

Per avaluar la proliferació de cèl·lules de l'hipocamp, la supervivència i la diferenciació, 2 dies després d'haver-se realitzat les proves conductuals, als ratolins, se'ls injectava intraperitonealment 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma, Steinheim, Alemanya) durant dos dies consecutius a una dosi de 100 mg/Kg per dia. Per avaluar les fases de proliferació i supervivència cel·lular els animals eren anestesiats i sacrificats per decapitació un dia i 28 dies després de l'última injecció de BrdU, respectivament. Els cervells eren extrets ràpidament i dividits coronalment en dos seccions. Un terç de la part rostral es va emmagatzemar a -80°C per fer la determinació de beta amiloide, mentre que 2/3 del cervell caudal era postfixat durant 4 dies en paraformaldehid al 4% en tampó fosfat (PBS) a 4°C. Per crioprotegir el teixit, al cinquè dia els cervells es van passar a una solució que contenia un 30% de sacarosa en tampó fosfat durant 48 hores a 4°C. Després aquestes mostres eren congelades utilitzant isopentà i posteriorment es van fer talls seriatos de 40 µm que es van emmagatzemar a -20°C en solució crioprotectora.

#### Immunohistoquímica

Per fer la immunohistoquímica s'agafava una de cada sis seccions coronals, serialment disposades. Aquestes eren rentades amb TBS abans de bloquejar la peroxidasa endògena amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a un 0,6% en TBS. Per desnaturalitzar l'ADN, les mostres van estar 30 min a 37°C en 2 N HCl i van ser rentades a continuació amb un tampó borat de sodi 0.1 M. Per bloquejar les unions inespecífiques, les seccions van estar 30 min a temperatura ambient en TBS-plus (3% de sèrum de cabra i 1% de Tritó-X). L'anticòs contra la BrdU (Serotec, Oxford, Regne Unit) es va diluir 1:500 en el TBS-plus i es va incubar durant una nit a 4°C. Al dia següent els talls eren rentats amb TBS i TBS-plus, les mostres van ser incubades amb l'anticòs secundari antirata biotinitat (Laboris Vector, Burlingame, EUA) 1:500 en TBS-plus durant dues hores. Després d'alguns rentats amb TBS l'anticòs secundari va ser detectat mitjançant l'avidina-biotina (ABC Elit kit). La diaminobenzidina (DAB, Laboris Vector, Burlingame, EUA) va ser



## Materials i Mètodes

utilitzada com a cromogen. Les seccions van ser rentades i muntades en portes i coberts amb el mitjà de muntatge DPX.

Per realitzar la triple immunofluorescència de proliferació (BrdU), neurona madura (NeuN) i astròcits (GFAP), les mostres van ser rentades diverses vegades amb TBS, col·locades durant 30 min en 2 N HCl a 37°C i rentades amb tampó borat de sodi 0.1 M. Com a bloquejador es va utilitzar el TBS-plus. Les mostres es van incubar amb els anticossos primaris dissolts en el TBS-plus; concretament, BrdU 1:500 (Serotec, Oxford Regne Unit), NeuN 1:200 (Chemicon Internacional, Temecula, EUA) i GFAP 1:160 (Sigma, Saint Louis, EUA) durant 48 hores a 4°C. En el pas següent les mostres van ser rentades amb TBS i TBS-plus i es van incubar amb els anticossos secundaris (Alexa Fluor 488, 568 i 660 Fisher BioBlock Científica, Madrid, Espanya) diluïts a una proporció d'1:250 durant 4 hores a temperatura ambient. En finalitzar aquest temps es van realitzar rentats amb TBS, es van col·locar les seccions en un porta i es van muntar amb una agent *anti-fading* (Slowfade<sup>®</sup> Gold Antifade reagent, Invitrogen) per ser guardades posteriorment a 4°C.

## 3.4 Quantificació

### Cèl·lules BrdU positives

El número total de noves cèl·lules nascudes van ser comptades bilateralment en la capa de cèl·lules granulars del gir dentat i en l'hilus de l'hipocamp d'una de cada sis seccions coronals seriades. De manera que el conjunt de seccions escollides és una sisena part de tot l'hipocamp i seria una representació de l'hipocamp sencer. Per comptabilitzar les cèl·lules marcades amb BrdU es va utilitzar un microscopi òptic (Olympus, CH20), a l'objectiu de 100 x. Les cèl·lules en el pla focal superior eren descartades per evitar el doble recompte de les cèl·lules (Encinas i Enikolopov, 2008). L'estimació total de nombre de cèl·lules es va obtenir multiplicant el número total comptat per 6.

En el cas de la supervivència i diferenciació, el comptatge es va realitzar mitjançant sistemes d'escaneig de microscòpia confocal (Nikon T2000E). El nombre total de cèl·lules BrdU positives, així com el nombre total de noves cèl·lules diferenciades a neurona (NeuN) o a

astròcit (GFAP) van ser comptades en el gir dentat i a l'hilus tant de l'hipocamp dret com de l'esquerre mitjançant triple marcatge (BrdU, BrdU-NeuN o BrdU-GFAP). L'estimació total és fruit de multiplicar els resultats obtinguts en el comptatge per 6.

### **Nivells de $\beta$ -amiloide**

Per determinar els nivells de beta amiloide en el cervell anterior dels animals es va homogeneïtzar el cervell anterior en un tampó amb 0,8 ml de HCl 5 M de guanidina i 50 mM Tris i es va centrifugar a 100.000 g durant 1 hora a 4°C. Els pèptids de beta amiloide de tipus 1-40 (A $\beta$ 40) o beta amiloide 1-42 (A $\beta$ 42) presents en el sobrenedant es van analitzar utilitzant un sandvitx ELISA mitjançant el producte obtingut comercialment de Biosource (Barcelona, Espanya). Els nivells totals de proteïnes es va determinar per un producte Bradford (Bio Rad, Barcelona, Espanya). Cada cervell es va analitzar per duplicat, i es va considerar la mitjana per als resultats.

### **Plaques de $\beta$ -amiloide**

Una de cada sis seccions coronals serialment disposades de 40  $\mu$ m fins tenir 10 talls per cada ratolí van ser utilitzades per fer el comptatge de plaques  $\beta$ -amiloide. En aquest cas els talls eren rentats diverses vegades i per inactivar la fosfatasa endògena, les seccions eren posades durant 30 min amb TBS i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,6%. A continuació vam disposar les mostres en TBS-Plus durant 30 min. Els anticossos monoclonals utilitzats en aquest cas van ser l'anti- $\beta$ -amiloide (1:500, Sigma, Sant Louis, EUA) i el GFAP (1:250 Sigma, Sant Louis, EUA) que juntament en el TBS-Plus van ser incubats durant 48 hores a 4°C. Passat aquest temps es van posar les mostres amb els respectius anticossos secundaris Alexa fluor 568 i 660 (Fisher Bioblock Científica, Madrid, Espanya) a una proporció d'1:250 durant 4 hores a temperatura ambient. Per finalitzar les mostres van ser rentades diverses vegades, i muntades utilitzant l'*anti-fading* (Slowfade<sup>®</sup> Gold Antifade reagent, Invitrogen). El nombre total de plaques de  $\beta$ -amiloide va ser comptat en cada animal mitjançant el microscopi làser confocal Nikon T2000E.

## *Materials i Mètodes*

### **Acumulació d'Alumini**

Les mostres de cerebel i cervell anterior van ser pesades i posades en *microinserts* de quars amb àcid nítric al 65 % (Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Alemanya). Aquestes van ser digerides en tubs de tefló en un digestor de Microones Milestone model Star D (Milestone, Sorisole, Itàlia) durant 30 minuts a 185°C i 1000W d'acord amb les instruccions del fabricant. Les mostres digerides van ser diluïdes amb aigua mili-Q fins arribar a un volum final de 5 ml. Per tal d'evitar la contaminació de les mostres tots els materials utilitzats durant el procés van ser netejats mitjançant diferents rentats amb aigua destil·lada, aigua mili-Q, àcid nítric al 10% i finalment amb aigua mili-Q. La fiabilitat de la tècnica es va provar a cada assaig mitjançant l'ús d'una referència estàndard de cervell de rata, preparada als nostres laboratoris, així com mitjançant l'ús d'un patró internacional de referència del *National Institute of Standards and Technology* (NIST material de referència 1577b, fetge boví) (Gomez i col·ls., 2008).

Finalment, es quantificava la quantitat d'Al mitjançant l'espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament (ICP-MS).

## ***IV. RESULTATS***



## 4.1 Fase experimental I

A la primera fase experimental d'aquesta tesi, vam valorar els efectes d'una dosi d'1 mg/g de lactat d'Al administrada mitjançant pinso amb suplement al llarg de 3 mesos en dues poblacions de ratolins (Tg2576/*Wild*) de cinc mesos d'edat. Es van avaluar aspectes generals (bateria d'observació funcional), conductuals (test de camp obert), cognitius (laberint aquàtic, test de reconeixement d'objectes) i de plasticitat (neurogènesi). Així mateix, també es van mesurar els nivells de proteïna beta amiloide, el número de plaques, el nivell de corticosterona i l'acumulació d'Al al sistema nerviós central.

Els resultats mostren que els ratolins transgènics, independentment del tractament, presenten una major activitat, així com deteriorament cognitiu en el laberint aquàtic de Morris i en el test del reconeixement d'objectes, i nivells de  $\beta$ -amiloide més elevats que la població de ratolins *wild*.

En aquest cas, efectes diferencials de l'alumini depenent de la càrrega genètica dels ratolins són observats en el laberint aquàtic i en la neurogènesi. Pel que fa al laberint aquàtic l'exposició al metall sembla afectar principalment als animals no modificats genèticament, ja que l'aprenentatge en el cas dels animals transgènics és molt semblant al mostrat pel seu propi grup control. Respecte a la neurogènesi, els ratolins transgènics exposats al metall presenten un increment de la proliferació cel·lular en comparació als animals exposats no transgènics.

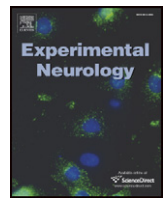




Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Experimental Neurology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexnr](http://www.elsevier.com/locate/yexnr)



# Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease

D. Ribes <sup>a,b</sup>, M.T. Colomina <sup>a,b,\*</sup>, P. Vicens <sup>a,b</sup>, J.L. Domingo <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Psychology and Research Center in Behavioral Assessment (CRAMC), "Rovira i Virgili University", 43007 Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, "Rovira i Virgili" University, San Lorenzo 21, 43201 Reus, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 April 2008

Revised 31 July 2008

Accepted 22 August 2008

Available online 12 September 2008

#### Keywords:

Aluminum

Alzheimer

Tg 2576

Neurogenesis

$\beta$ -amyloid

Spatial learning

Water maze

### ABSTRACT

The effects of a very low oral dose of Al on spatial learning and neurogenesis were evaluated in a transgenic mouse (Tg 2576) model of Alzheimer disease. At 5 months of age, wild and Tg 2576 mice received a diet supplemented with Al lactate at 0 and 1 mg/g of diet for 120 days. The experimental groups ( $n = 7-8$ ) were: control wild, Al-treated wild, control transgenic, and Al-treated transgenic. After 3 months of Al exposure, activity in an open-field and learning in a water maze were evaluated. At the end of the behavioral testing, in order to study cell proliferation and differentiation in the hippocampus, mice were injected with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) and sacrificed 1 or 28 days after the last BrdU injection. Tg 2576 mice were impaired in both acquisition and retention of the water maze task, showing higher amounts of  $\beta$ -amyloid fragments in brain. Aluminum exposure impaired learning and memory in wild mice and increased the total number of proliferating cells in the dentate gyrus of hippocampus. The low Al doses here experimented suggest that this element might impair cognition in the general population at doses comparable to current levels of human exposure. Although these doses are not enough to interact with the amyloidogenic pathway, an increase in cell proliferation can indicate a reactive response of the brain to Al insult. Further investigations should be performed to corroborate the effects observed at very low doses of Al and to study the potential effects derived from a longer exposure period.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Aluminum (Al), a non-essential element, is ubiquitous in industrialized societies. Usually, human exposure is primarily through the diet. The typical adult intake is estimated in 3–12 mg/day according to dietary Al studies conducted in many countries (Saiyed and Yokel, 2005). Because of the supposed biological inert properties and its low oral absorption, the Al use on foodstuffs, beverage cans, and pharmacological and cosmetic compounds has been very common. However, it is well established that Al is neurotoxic, and when ingested it can access into the brain. Some epidemiological studies have suggested a possible relationship between water Al content and AD (McLachlan et al., 1996; Altmann et al., 1999; Gauthier et al., 2000; Flaten, 2001; Exley and Esiri, 2006), whereas in contrast, exposed workers to Al showed impaired cognitive functions (Rifat et al., 1990; Polizzi et al., 2002; Giorgianni et al., 2003). On the other hand, experimental studies have shown that intracerebroventricular infusions of Al in rabbits and cats induced neurofibrillary tangles (Savory et al., 1995, 2006). More recent investigations have demonstrated that Al is linked to beta amyloid deposition in vivo and in vitro (Kawahara, 2005), induces oxidative stress in the brain (Pratico et al., 2002;

Esparza et al., 2003), increases beta amyloid deposits in transgenic mice models (Pratico et al., 2002), and induces neuropathological changes in brains (Szutowicz, 2001; Fattoretti et al., 2004; Rodella et al., 2008). However, experimental studies using rodent models have failed to establish a consistent link between Al exposure even at high levels and cognitive impairment, enhancing the controversial about Al role at lowering AD thresholds (Krewski et al., 2007). Moreover, it is known that rodents are quite resistant to neurodegeneration (Golub et al., 2000; Roig et al., 2006). For this reason, transgenic models more prone to this pathology can be of inestimable interest to elucidate the role of Al in neurodegeneration. In relation to this, a recent study conducted with the transgenic model (Tg 2576) of AD provided evidences to link Al and AD (Pratico et al., 2002).

The Tg 2576 mouse model overexpresses the  $\beta$ APP gene with the human Swedish mutation (Hsiao, 1995), favoring the cleavage of APP by the enzyme  $\beta$ -secretase against  $\alpha$ -secretase (Yan et al., 1999), leading to an excess of beta products that finally deposits and form senile plaques. These deposits begin late in this mouse model, approximately at 9–12 months of age (Kawarabayashi et al., 2001). However, a role of soluble  $\beta$ -amyloid on cortical neurotransmission in learning deficits observed in these mice before significant plaque load has been suggested (Klingner et al., 2003). Most results on behavioral phenotype related to spatial memory performance indicated for this mutant deficits beginning at 11–15 months (King and Arendash,

\* Corresponding author. Fax: +34 977 759322.

E-mail address: [mariateresa.colomina@urv.cat](mailto:mariateresa.colomina@urv.cat) (M.T. Colomina).



2002), when tested with the classic version of the Morris water maze test (MWM) (Morris, 1984).

On the other hand, in most regions of the mammalian central nervous system (CNS), cumulative evidence has shown that neurogenesis persists in restricted areas of the adult brain in rodents, primates and humans (Altman and Das, 1965; Gould et al., 1997). Hippocampal neurogenesis is greater in young subjects declining steadily with age (Cameron and McKay, 1999). However, an increased neurogenesis associated with high levels of beta amyloid have been observed in AD patients and some mice models of neurodegenerative processes at early stages of the disease (Chen et al., 2008; Gan et al., 2008).

The aim of the present study was to assess the behavioral effects of oral Al in an animal model (Tg 2576 mouse) which carries a transgene coding for the 695-amino acid isoform of human Alzheimer  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) precursor protein derived from a Swedish family with early-onset Alzheimer's disease (AD). The main objective was to evaluate whether intake of Al at low doses could accelerate behavioral and spatial learning deficits observed in transgenic mice, as well as to assess the effects on cell proliferation, survival and differentiation of cells in the dentate gyrus (DG). The possible relationship with beta amyloid production in normal (wild type) and a vulnerable (Tg 2576) mice population was also assessed.

## Materials and methods

### Animals and treatment

Sixteen transgenic male (Tg 2576) and 15 wild control mice (Taconic Europe, Lille Skensved, Denmark) were used. Animals were quarantined for 7 days after shipping and individually housed in plastic cages in an animal room, which was maintained at a temperature of  $22 \pm 2$  °C, a relative humidity of  $50 \pm 10\%$ , and a 12-h light/dark automatic light cycle (light: 0800–2000 h). All animals were allowed free access to food and water and given normal chow diet (Harlan, Barcelona, Spain) until 5 months of age. At that time, control mice received normal chow while Al-treated mice were fed rodent chow supplemented with Al lactate at 0 or 1 mg/g of diet, which means 0 or 0.101 mg of Al/g for 120 days. The experimental groups ( $n = 7-8$ ) were distributed as follows: control wild, Al-treated wild, control transgenic (control Tg), and Al-treated transgenic (Al Tg). Body weight food and water consumption were measured twice a month during the treatment period. The study was approved by the Animal Care and Use Committee of the "Rovira i Virgili" University (Tarragona, Spain).

### Behavioral assessment

At 3 months of oral Al exposure (8 months of age at the beginning of testing), activity in an open-field and learning in a Morris water maze (MWM) were evaluated. Animals were 9 months old at the end of the behavioral analysis.

### Open-field

General motor activity and behavioral responses to a novel environment were measured in an open-field apparatus, consisting of a wood  $1 \times 1$  m square surrounded by a 47 cm-high dark colored wall. Two areas were differentiated in the open-field, the periphery (the area 10 cm from the wall) and the central area (comprising the rest of the open-field). Mice were placed in the centre of the arena at the beginning of the test being allowed to move freely around the open-field and to explore the environment for 15 min. The path and movements of the animals were recorded by a video camera (Sony CCD-IRIS model) that was placed above the square. The video tracking program Etho-Vision<sup>®</sup> (Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands) was used to measure the total distance traveled,

time spent in each area, and the number of rearings (as a measure of vertical activity).

### Morris water maze

The water maze consisted of a circular tank (diameter: 1 m; high: 60 cm), divided into four quadrants. An escape platform (10 cm of diameter) was located 1 cm below the water surface in the target quadrant. Animals performed 3 trials per day for five consecutive days. During each trial, mice were allowed 60 s to find the hidden platform and remain on it for 30 s. If the animal failed to find the platform at this time, it was then put onto it by the experimenter. The inter-trial interval was 30 s. The order of the three starting positions was randomized along days for each mouse. To avoid proximal cues and prevent egocentric learning, an internal mobile wall was added to the maze, and the wall was randomly moved between trials. At the end of the fifth acquisition day, 4 h after the last training session, retention of the task was assessed by a probe trial, which consisted of a 60 s free swim without the escape platform. Seventy-two hours after the last training session, retention of the task was again tested by using the same procedure. Animal performance was recorded by a video camera placed above the maze and data were analyzed by the video tracking program Etho-Vision<sup>®</sup>. The latency to find the escape platform, distance traveled, and swim velocity during the training sessions were measured. During the probe trials, total time spent in the target quadrant and time spent in others quadrants were measured in order to compare the time searching in the target quadrant to the average time spent in the other quadrants.

To assess possible motor or motivational deficits in the water maze, one trial in a visual version of the water maze was performed immediately after the last probe trial. At this version of the maze, the escape platform was located in the same position but lifted 1 cm above water level. A pole with a white flag was inserted on the top as a viewing aid.

### Bromo-deoxyuridine administration and sample collection

To evaluate hippocampus cell proliferation, survival and differentiation, 2 days after behavioral testing, 7 or 8 mice from each group were i.p. injected with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, Steinheim, Germany) at 100 mg/kg/day during two consecutive days. One and 28 days after the last BrdU injection, animals were deeply anaesthetized with tribromoethanol and sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed from the skulls and divided coronally by free hand in two sections. One-third of the anterior section was stored at  $-80$  °C until beta amyloid determination, while the remaining two-third posterior brain was post-fixed for 4 days at 4 °C in 4% paraformaldehyde. On the fifth day, brains were transferred to a 30% sucrose/phosphate buffered solution (PBS) for 48 h at 4 °C, and then snap frozen in isopentane. Serial coronal sections, 40  $\mu$ m thick, were cut with a cryostat and collected according to a fractionator principle (West et al., 1991). Samples were stored at  $-20$  °C in a cryoprotection buffer (40% phosphate buffer 0.1 M, 30% glycerol, and 30% ethylene glycol) for later immunohistochemical analyses.

### Immunohistochemistry

One out of six sections was taken for biotinylated-BrdU immunostaining. Free-floating coronal sections of brain were rinsed in TBS and inactivated for endogen phosphatase activity in 0.6%  $H_2O_2$ -TBS. Sections were then treated for DNA denaturation incubating in 2 M HCl at 37 °C and rinsed in 0.1 M sodium borate buffer. Sections were blocked in TBS-Plus containing 3% normal goat serum and 1% Triton-X in TBS for 30 min. Antibody against BrdU (Serotec, Oxford UK) was diluted 1:500 in blocking buffer and incubated overnight at 4 °C. Following this incubation, tissue sections were washed with TBS-Plus

and incubated with secondary antibody (biotinylated anti-rat IgG, 1:500, Vector Laboratories, Burlingame, USA) for 2 h. After additional washes, the secondary antibody was detected using the avidin–biotin complex reaction (ABC Elite Kit). Diaminobenzidine (Vector Laboratories, Burlingame, USA) was used as chromogen. Sections were thoroughly washed, mounted, and cover slipped.

For triple-labeling immunofluorescence primary BrdU (Serotec, Oxford UK), NeuN (Chemicon International, Temecula, USA) and GFAP (Sigma, Saint Louis, USA) antibodies were used. After pre-treatment (see above) and a blocking step with TBS-plus containing 3% donkey serum, sections were incubated in a mixture of antibodies against BrdU (1:500), NeuN (1:200), and GFAP (1:160) for 48 h at 4 °C. After washing in TBS and TBS-plus, a cocktail of secondary antibodies (1:250) to detect BrdU, NeuN, and GFAP (Alexa Fluor 488, 568 and 660; Fisher Bioblock Scientific, Madrid, Spain) was applied for 4 h at room temperature. Sections were again washed, mounted, and cover slipped.

#### Quantification of BrdU positive cells

Data for proliferation were obtained by using methods of unbiased stereology. The total number of BrdU positive cells in the granular cell layer and hilus of the bilateral entire hippocampus were exhaustively counted in one out of 6 serial coronal sections of the brain. Each section was 240  $\mu$ m apart from each other. The set of selected sections represents one sixth of the whole hippocampus, being representative of the total hippocampus. Positive cells were counted by means of optic microscopy (Olympus, CH20) through a 100 $\times$  objective. Cells in the uppermost focal plane were discarded to avoid counting twice cells cut in two parts (Encinas and Enikolopov, 2008). The estimation of the total number of BrdU positive cells was obtained by multiplying the total number counted by 6 and reported as total number of cells.

To study survival and differentiation, fluorescence signals were detected by Nikon T2000E laser-scanning confocal microscopy. The total number of BrdU positive cells, as well as the total number of BrdU-NeuN and BrdU-GFAP cells in dentate gyrus and hilus of both right and left hippocampus were exhaustively counted in one out of 6 serial coronal sections. The estimation of the total number of BrdU, BrdU-NeuN and BrdU-GFAP was obtained by multiplying each value by 6. Data are presented as the percentage of BrdU-NeuN or BrdU-GFAP out of the total number of BrdU positive cells.

#### $\beta$ -amyloid determination

Cerebral cortical tissue ( $n=5$  per group) (100 mg of wet weight) were homogenized in 0.8 ml of 5 M guanidine HCl and 50 mM tris buffer, and centrifuged at 100,000 $\times$ g for 1 h at 4 °C. The  $\beta$ -amyloid peptides present in the supernatant were analyzed using a sandwich ELISA system for either  $\beta$ -amyloid 1–40 (A $\beta$ 40) or  $\beta$ -amyloid 1–42 (A $\beta$ 42) commercially obtained from Biosource (Barcelona, Spain). Total protein levels were also determined by a Quick start Bradford protein assay kit (Bio Rad, Barcelona, Spain). The beta amyloid levels were expressed as ng/mg of protein. Each brain was analyzed in duplicate or triplicate, with the average value reported for each brain.

#### Statistical analyses

Behavioral data were analyzed by a two-way ANOVA (genotype $\times$ Al treatment). Repeated measures multivariate analysis of variance with day or period of time as the within-subject factor was also used when appropriate. One-way ANOVA and post hoc Tukey test were used to analyze differences between groups. Analyses for variance homogeneity using a Levene test were performed. Kruskal–Wallis test, and the Mann–Whitney  $U$  test were used when appropriate. Significance was set at  $p<0.05$ .

## Results

### General observations in mice during the period of treatment

At the beginning of the experiment, a significant general effect of genotype was observed in body weight. This significant difference [ $F(1,28)=11,628$ ,  $p=0.002$ ], remained during the whole experimental procedure, and no effects of treatment were observed. Moreover, a significant general effect of genotype was also observed in water intake [ $F(1,28)=10,727$ ,  $p=0.003$ ]. Thus, transgenic mice drunk more water than wild type mice. Significant effects of treatment were observed in both food [ $F(1,28)=10,944$ ,  $p=0.003$ ] and water consumption [ $F(1,28)=4736$ ,  $p=0.038$ ] during the whole exposure period. Aluminum-treated mice drunk more water and ingested a lower quantity of food. Two animals of the control wild group were eliminated for excess weight, and one for thigmotaxic behavior. In the group of Al-treated wild mice, two animals were also eliminated for excess in body weight. These subjects were excluded for all the analysis.

### Open-field

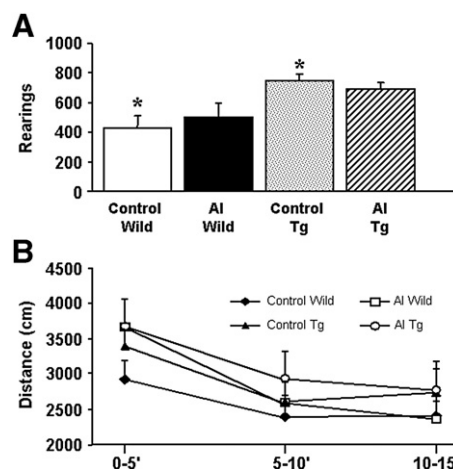
The total distance traveled (horizontal activity) and the total numbers of rearings (vertical activity) in an open-field were evaluated. General activity was analyzed by two-way ANOVA (Al $\times$  genotype). Only an overall effect of genotype was observed in the total number of rearings [ $F(1,28)=12,884$ ,  $p=0.001$ ], showing that transgenic mice performed a greater number of rearings in the open-field when compared with wild mice (Fig. 1A). Neither another factor nor interactions were statistically significant.

To evaluate habituation effects, the 15 min period was divided in fractions of 5 min. A two-way ANOVA (Al $\times$ genotype) for repeated measures was performed to test horizontal activity. Although habituation to the open-field was observed [ $F(2,28)=25.608$ ,  $p<0.001$ ], no effect of factor group was detected in any fraction of time (Fig. 1B).

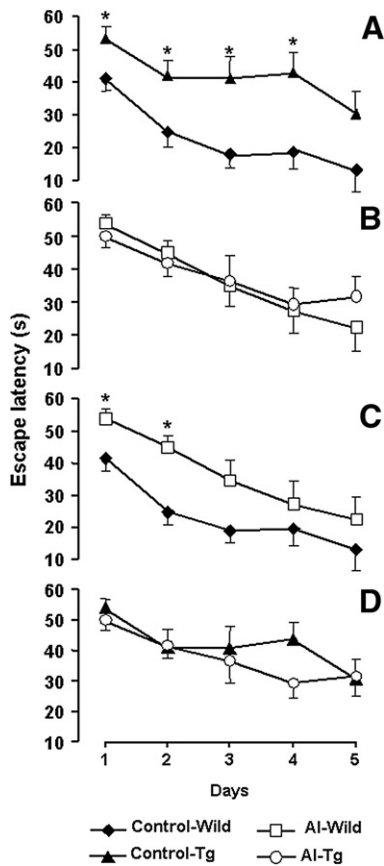
### Morris water maze

#### Acquisition

To evaluate acquisition in the water maze, a two-way ANOVA for repeated measures was performed to assess any overall effects of factors Al or genotype, or their interactions on latency to the platform, distance traveled, and swim velocity during task acquisition.

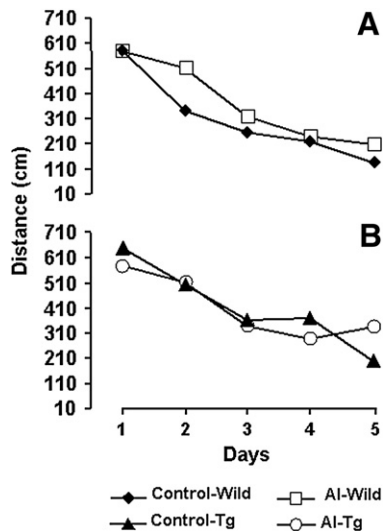


**Fig. 1.** Number of rearings in an open-field (A) and distance traveled in an open-field over 15 min (B). An asterisk indicates significant ( $p<0.05$ ) differences between groups. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M.

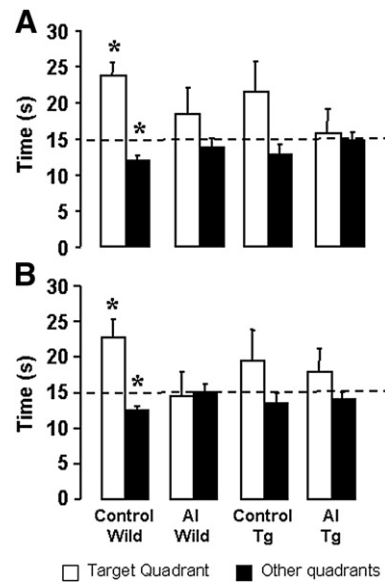


**Fig. 2.** Morris water maze performance across 5 days of acquisition in control wild and Tg 2576 mice (A), AI-treated wild and Tg 2576 mice (B), wild control and exposed to AI (C) and Tg 2576 control and exposed to AI (D). An asterisk indicates significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

An overall effect of genotype factor was detected in escape latency [ $F(1,28) = 5.447, p = 0.027$ ], showing a deterioration of learning acquisition in transgenic mice. Although the AI factor was not statistically significant, an interaction between genotype and AI exposure was detected [ $F(1,28) = 4.268, p = 0.048$ ] in escape latency. Due to overall effect of genotype, treatment effects were analyzed by genotype. One-

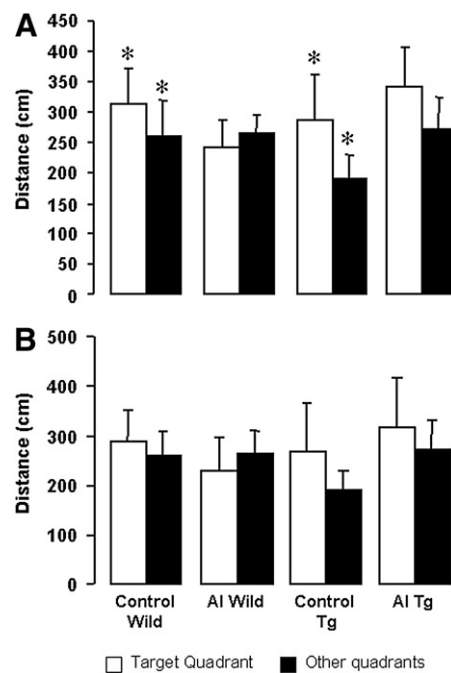


**Fig. 3.** Distance traveled in the Morris water maze across 5 days of acquisition in control wild and AI-treated wild (A), and Tg 2576 control and Tg 2576 exposed to AI (B). Data are expressed as mean.

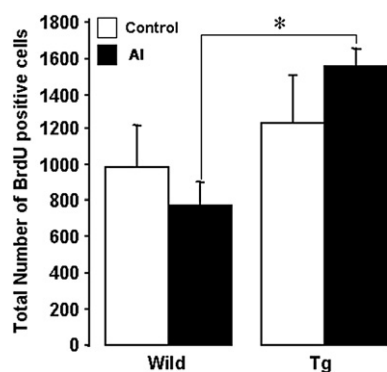


**Fig. 4.** Retention in the water maze task. The mean time spent in the target quadrant with regard to other quadrants at 4 (A) and 72 h (B). A dashed line indicates equal chance performance. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant retention of the task ( $p < 0.05$ ).

way ANOVA for AI-untreated animals also showed higher latencies in transgenic control mice than in wild controls: [ $F(1,13) = 11.025, p = 0.006$ ] (Fig. 2A). These differences were observed during the fourth first days of acquisition. No significant differences were found between AI-exposed animals (Fig. 2B). Again, due to the interaction between treatment and genotype, a more detailed analysis was performed in order to assess AI effect within different genotype. One-way ANOVA showed significant differences between groups (AI-treated and control) in wild mice [ $F(1,13) = 4.676, p = 0.05$ ], showing that AI caused a deleterious effect in acquisition in the water maze of



**Fig. 5.** Retention in the water maze task. The mean distance traveled in the target quadrant with regard to other quadrants at 4 (A) and 72 h (B). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant retention of the task ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 6.** Estimate total number of BrdU positive cells (proliferation) in the hippocampus. Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U test were used for comparison between groups. Data are expressed as mean±S.E.M. An asterisk indicates significant differences between groups ( $p<0.05$ ).

wild mice (Fig. 2C). No significant differences were observed between control and treated transgenic mice (Fig. 2D). No significant differences were observed in distance traveled (Fig. 3), or swim velocity. In general terms, results indicate an impaired acquisition in Al-exposed transgenic and wild mice.

#### Retention

Two different probe trials were performed at 4 and 72 h after the last acquisition day. Four hours after acquisition, no significant effects emerged when behavior was analyzed in the target quadrant.

Seventy-two hours after learning the task, no significant differences between groups were detected. However, an overall effect of Al in the velocity in the target quadrant could be noted [ $F(3,26)=4.286$ ,  $p=0.014$ ]. A more detailed ANOVA by genotype and treatment showed that wild animals treated with Al swam faster than control wild mice. Neither another factor nor interactions reached the level of statistical significance.

In order to better analyze performance during probe trial, a *t*-test was carried out by comparing time spent and distance traveled in the target quadrant (Northwest, NW) and mean time and distance in the other 3 possible quadrants of the pool [(Time in NE+Time in SO+Time in SE)/3] in each group. Significant differences were only detected in the time control wild animals spent in the target quadrant at 4 ( $p=0.004$ ) and 72 ( $p=0.025$ ) hours after the last acquisition trial (Fig. 4). It shows that only control wild animals remember the platform position. Significant differences were also detected in the distance traveled by control wild animals ( $p=0.040$ ) and transgenic control mice ( $p=0.049$ ) in the target quadrant at 4 h after the last acquisition trial. However, there were no differences 72 h after the last acquisition trial (Fig. 5). It indicates a consistent retention for control wild mice.

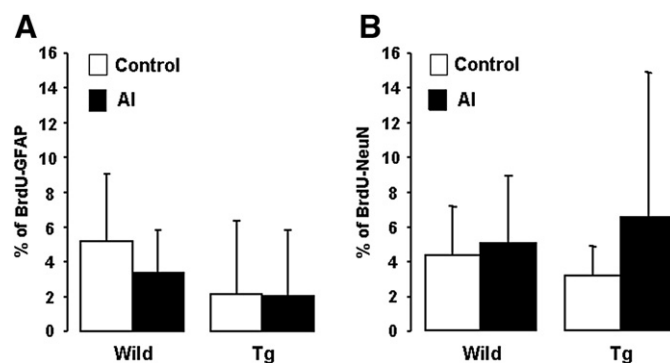
#### Proliferation, survival and differentiation of new born cells

##### Proliferation

The number of BrdU positive cells 24 h after BrdU injection was significantly affected by the genotype of the animal [ $F(1, 14)=7.235$ ,  $p=0.021$ ] indicating a higher proliferation in transgenic mice. No another factor or interactions reached the level of statistical significance.

**Table 1**  
Survival and differentiation of new born cells in hippocampal hilus and dentate gyrus

	Total BrdU	BrdU-NeuN (%)	BrdU-GFAP (%)
Control wild	174	7,5 (4.31%)	9 (5.17%)
Al wild	178,5	9 (5.04%)	6 (3.36%)
Control Tg	282	9 (3.19%)	6 (2.13%)
Al Tg	292,8	19,2 (6.56%)	6 (2.05%)



**Fig. 7.** Percentage of double labeled BrdU-GFAP cells from total BrdU positive cells indicates new born cells differentiated to glia (A). Percentage of double labeled BrdU-NeuN cells from total BrdU positive cells indicate new born cells differentiated to neurons (B). Data are expressed as mean±S.E.M.

To assess differences between groups, a nonparametric Kruskal–Wallis test was applied. Statistically significant differences ( $p=0.041$ ) were observed. Aluminum exposure significantly increased the number of BrdU positive cells in transgenic mice when compared to the respective Al-treated wild mice ( $p=0.021$ ) (Fig. 6).

#### Survival and differentiation

Survival and differentiation of the new born cells were evaluated 28 days after the last BrdU administration (Table 1). Results show a non-significant increase in the number of BrdU positive cells and double labeled BrdU and NeuN cells in transgenic mice when compared to wild type animals (Fig. 7). With regard to differentiation to glial cells, double labeled BrdU and GFAP did not differ between groups (Fig. 7).

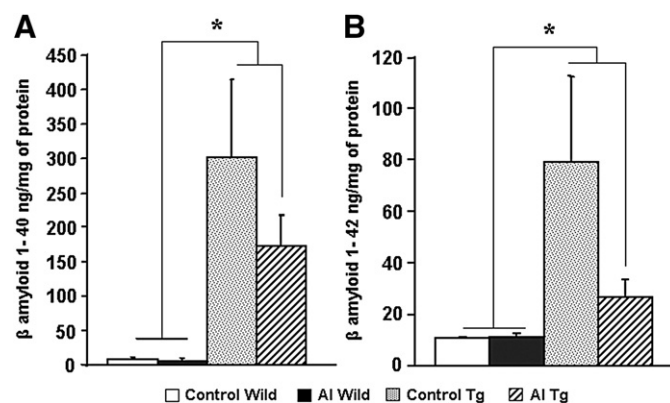
#### $\beta$ -amyloid levels

With regard to  $\beta$ -amyloid levels, an overall effect of the genotype in both A $\beta$ <sub>1–40</sub> [ $F(1,19)=14.175$ ,  $p=0.002$ ], and A $\beta$ <sub>1–42</sub> [ $F(1,19)=6.055$ ,  $p=0.026$ ] levels were observed. As expected, transgenic mice showed increased concentrations of both A $\beta$ <sub>1–40</sub> and A $\beta$ <sub>1–42</sub> fragments. Although Al-treated transgenic mice showed lower levels of  $\beta$ -amyloid fragments, no significant Al effects were detected (Fig. 8).

#### Behavioral correlations

##### Proliferation, survival and differentiation

Pearson's test indicated no significant correlation between new born cells proliferation and any measure in the acquisition and retention in the Morris water maze or in the exploration in the open-field.



**Fig. 8.**  $\beta$ -amyloid (A) 1–40 and (B) 1–42 levels quantified by ELISA in anterior brain cortex, expressed in ng/mg of protein. Data are expressed as mean±S.E.M. Groups showing asterisks are significantly different at  $p<0.05$ .

### *A $\beta$* protein

When the Pearson's test for behavior in the water maze and A $\beta_{1-40/1-42}$  levels was performed, a positive correlation was only observed between the total distance traveled during acquisition of the water maze and A $\beta_{1-40}$  levels (Pearson's=0.446,  $p=0.049$ ) suggesting a relationship between high levels of A $\beta_{1-40}$  and an impairment in learning. As expected, significant correlations between A $\beta_{1-40/1-42}$  and the animal genotype were also found (A $\beta_{1-40}$ : Pearson's=0.662,  $p=0.001$ ; A $\beta_{1-40}$ : Pearson's=0.476,  $p=0.034$ , respectively).

### Discussion

In recent years, a number of genetic modified mice have been generated as potential mouse models of neurodegenerative processes (Gotz et al., 2004). These models have contributed largely to the knowledge of neuropathological changes associated to different stages of these diseases (Ashe, 2001; Richardson and Burns, 2002). In the present study, we have compared the behavioral effects of a low dose of oral Al in a transgenic mouse model of AD and wild type mice. We have also investigated the differences in neurogenesis and  $\beta$ -amyloid production induced by both Al exposure and genotype at 9 months of age. The current Al dose ingested by mice is about 17 mg/kg/day, which for humans of 70 kg body weight would correspond to 1190 mg Al/day. It is important to remark that the Al dose here administered is not far from the doses ingested by certain persons chronically consuming Al-containing antacids, or buffered aspirins, important sources of human Al exposure (Krewski et al., 2007).

Aluminum exposure did not induce changes in exploratory behavior to a novel environment measured in an open-field test, neither in wild nor in transgenic mice. The only remarkable effect was an increased number of rearings in the transgenic model. Vertical activity has been studied as a possible component of anxiety or hyperactive behavior. Previous investigations have also found similar enhanced behaviors in Tg 2576 mice (King et al., 1999; Lalonde et al., 2003).

Learning and memory measured in a water maze showed differences in acquisition between genotypes, and a differential effect of Al depending on the genotype. The Morris water maze test has been one of the most popular tests used in the study of spatial learning and memory, and it has been proven to be sensitive for a number of conditions including age induced spatial deficits. However, differences in methods such as the number of trials per day, the location of extra maze cues, or the control of intra-maze cues can either increase or decrease the sensitivity and the specificity for this test (Wolff et al., 2004; Vorhees and Williams, 2006). Thus, modifications in water maze protocol can result in apparently contradictory or disappointing results. An interesting point of discussion is the sensitivity of the MWM protocol used for this experiment, which allows to detect differences between Tg 2576 and wild type at earlier stages than those previously reported (Arendash and King, 2002; King and Arendash, 2002). With respect to this, some studies in Tg 2576 mice showed deficits at different ages (Hsiao et al., 1996; Westerman et al., 2002), while other investigations performed in the same range of ages did not find any effect on the water maze task (King et al., 1999; King and Arendash, 2002; Bizon et al., 2007). Therefore, it is interesting to highlight the importance of increasing the demands of the task by diminishing the number of trials per day, and by controlling intra-maze cues to avoid and egocentric learning strategy in order to better detect functional deficits at early states of neurodegeneration. It is of special relevance in toxicological studies, where subtle deficits could be masked by using protocols of massive learning created to test marked deficits induced by either lesions in the CNS or pharmacological strategies.

Surprisingly, Al exposure affected wild type mice, but did not affect Tg 2576 mice during the acquisition period in the MWM task. Moreover, the wild type control group was the only group showing a consistent retention in both, time spent and distance in the target

quadrant. It means a higher period of time in the target quadrant compared to that observed by chance, which indicates that Al-exposed wild mice remembered worse as did Al-exposed Tg 2576 mice and Tg 2576 mice non-exposed to Al. Moreover, wild type control group reduced the swimming speed in the target quadrant indicating a more efficient search of the platform (Hollup et al., 2001), while Al-exposed wild type group showed a significantly higher velocity in this quadrant when compared to the control group. This supports the Al deleterious effects on wild type mice observed during the acquisition period. On the other hand, a more extended training than that used in this experiment could have improved retention in the Tg 2576 mice differentially depending on Al exposure. In a previous study, Golub and German, (2001) showed that female mice exposed to higher Al doses were slower than controls in learning the Morris maze. Notwithstanding, no differences between groups were observed in the retention of the task. In contrast, some authors described a memory improvement in water maze performance (Golub et al., 2000; Colomina et al., 2005), while other investigations found a deleterious Al effect (Miu et al., 2003; Jing et al., 2004). These controversial results could be due to the Al dose, the route and chemical form administered, as well as the experimental animal type. It is worthy to note the low Al doses given in this study. Some in vivo and in vitro data suggested that Al can induce biphasic dose-dependent effects in some neurotransmitter systems, intercellular signaling molecules, and behavior (Kumar, 1998; Trombley, 1998; Kim, 2003; Roig et al., 2006).

With regard to possible Al interactions with the genotype, behavioral observations indicated that low doses of this element did not impair acquisition in Tg 2576 mice, suggesting no interactions with the amyloidogenic pathway at initial states. However, it cannot be discarded that a more prolonged period of Al exposure, and/or an exposure to higher Al doses could increase the effects in both wild and Tg 2576 mice.

Neurogenesis has been extensively studied in adult brains in relation to learning and memory processes (Kempermann, 2008; Zhao et al., 2008). It can be modified by a number of physiological and pathological factors. The current results show an overall effect of animal type, being Tg 2576 mice those with a greater number of new born cells. These results are in accordance with some recent data showing an increased neurogenesis at early stages of neurodegeneration followed by a dramatically decrease at late neurodegenerative states (Chen et al., 2008; Gan et al., 2008). Moreover, other authors reported increased neurogenesis in AD patients and several mice models of AD (Brazel and Rao, 2004; Jin et al., 2004; Gan et al., 2008). It suggests a compensatory mechanism after brain damage. In this sense, neurogenesis has been proposed to be an interesting marker of the evolution of the disease and a possible therapeutic target (Chen et al., 2008). However, Dong et al. (2004) found a decrease in hippocampus cell proliferation in Tg 2576 mice at 3, 6 and 9 months of age. The differences in the results concerning neurogenesis and cell proliferation related to AD mice models could be attributed to differences in the BrdU dose, duration of the treatment, and age of the animals (Gan et al., 2008). In the current study, it could be also related to the previous exposure to the water maze task, which is more challenging for Tg 2576 mice than for wild type. The functional role of these new born cells in neurodegeneration is not well understood yet. Some studies point at a possible compensatory mechanisms by which AD patients increase cell proliferation (Brazel and Rao, 2004; Jin et al., 2004). However, hippocampus cell proliferation could be also an unspecific reactive response to brain injury. In fact, our results show a greater cell proliferation in Tg 2576 mice exposed to Al, suggesting a different influence of Al depending on the type of animal. A possible explanation could be related with an accelerated process in Al-treated mice, being these animals, even at early stages, in a more advanced phase of the neurodegenerative process. Notwithstanding, the functional importance of this proliferation is limited, as no differences were observed in differentiation and survival of the new born cells.

With regard to  $\beta$ -amyloid levels, our results show increased levels of both  $\beta_{1-40}$  and  $\beta_{1-42}$  amyloid fragments. An increased neurogenesis related to the initial phases of A $\beta$  plaque formation has been recently suggested (Gan et al., 2008). Although in this study beta amyloid levels seem to be lower in Tg 2576 Al-exposed animals when compared to non-exposed Tg 2576 mice, significant differences were not found. Praticò et al. (2002) reported an increase in  $\beta$ -amyloid levels in Tg 2576 mice exposed to 1 mg Al/kg diet, a dose that is 10-times lower than that administered in the present investigation.

In summary, the current results show an increased neurogenesis and  $\beta$ -amyloid production in Tg 2576 mice accompanied by an impaired learning, while Al effects were mainly observed in wild mice. The only indicator of Al effects on Tg 2576 mice was an increased cell proliferation in hippocampus compatible with an accelerated neurodegenerative process. This, together with the finding that Al exposure did not impair either acquisition or learning in Tg 2576 mice, but impaired cognition in wild animals, suggests that effects on cognition at low Al doses should not be necessary related with an early potentiation of the amyloidogenic pathway. However, effects related to higher Al doses or more prolonged periods of exposure should not be discarded. In summary, the present data suggest that Al administered at low doses impaired learning and memory in non vulnerable mice, but do not influence learning and memory in Tg 2576 mice. Further studies assessing the relationship between Al exposure at higher doses, neurogenesis, and  $\beta$ -amyloid levels would be of notable interest.

### Acknowledgments

This research was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Salud, Instituto de Salud Carlos III (grant number PI041673), Spain.

### References

- Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124, 319–335.
- Altmann, P., Cunningham, J., Dhanesha, U., Ballard, M., Thompson, J., Marsh, F., 1999. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *BMJ* 319, 807–811.
- Arendash, G.W., King, D.L., 2002. Intra- and intertask relationships in a behavioral test battery given to Tg2576 transgenic mice and controls. *Physiol. Behav.* 75, 643–652.
- Ashe, K.H., 2001. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem.* 8, 301–308.
- Bizon, J., Prescott, S., Nicolle, M.M., 2007. Intact spatial learning in adult Tg2576 mice. *Neurobiol. Aging* 28, 440–446.
- Brazel, C.Y., Rao, M.S., 2004. Aging and neuronal replacement. *Ageing Res. Rev.* 3, 465–483.
- Cameron, H.A., McKay, R.D., 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci.* 2, 894–897.
- Chen, Q., Nakajima, A., Choi, S.H., Xiong, X., Sisodia, S.S., Tang, Y.P., 2008. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 29, 316–326.
- Colomina, M.T., Roig, J.L., Torrente, M., Vicens, P., Domingo, J.L., 2005. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 565–574.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C.A., Bertchume, A., Csernansky, J.G., 2004. Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress. *Neuroscience* 127, 601–609.
- Encinas, J.M., Enikolopov, G., 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol.* 85, 243–272.
- Esparza, J.L., Gomez, M., Romeu, M., Mulero, M., Sanchez, D.J., Mallol, J., Domingo, J.L., 2003. Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J. Pineal Res.* 35, 32–39.
- Exley, C., Esiri, M.M., 2006. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 877–879.
- Fattoretti, P., Bertoni-Freddari, C., Giorgetti, B., Ballei, M., 2004. Increased mitochondrial and nuclear gene expression of cytochrome oxidase subunits I and IV in neuronal aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030, 303–309.
- Flaten, T.P., 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 55, 187–196.
- Gan, L., Qiao, S., Lan, X., Chi, L., Luo, C., Lien, L., Yan Liu, Q., Liu, R., 2008. Neurogenic responses to amyloid-beta plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APPsw,Ind) mice. *Neurobiol. Dis.* 29, 71–80.
- Gauthier, E., Fortier, I., Courchesne, F., Pepin, P., Mortimer, J., Gauvreau, D., 2000. Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ. Res.* 3, 234–246.
- Giorgianni, C., Faranda, M., Brecciaroli, R., Beninato, G., Saffioti, G., Muraca, G., Congia, P., Catanoso, R., Agostani, G., Abbate, C., 2003. Cognitive disorders among welders exposed to aluminum. *G. Ital. Med. Lav. Ergonom.* 25, 102–103.
- Golub, M.S., Germann, S.L., 2001. Long-term consequences of developmental exposure to aluminum in a suboptimal diet for growth and behavior of Swiss Webster mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 23, 365–372.
- Golub, M.S., Germann, S.L., Han, B., Keen, C.L., 2000. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150, 107–117.
- Gotz, J., Streffer, J.R., David, D., Schild, A., Hoernl, F., Pennanen, L., Kurosinski, P., Chen, F., 2004. Transgenic animal models of Alzheimer's disease and related disorders: histopathology, behavior and therapy. *Mol. Psychiatry* 9, 664–683.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., Fuchs, E., 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492–2498.
- Hollup, S.A., Kjelstrup, K.G., Hoff, J., Moser, M.B., Moser, E.I., 2001. Impaired recognition of the goal location during spatial navigation in rats with hippocampal lesions. *J. Neurosci.* 21, 4505–4513.
- Hsiao, K.K., 1995. Understanding the biology of beta-amyloid precursor proteins in transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 16, 705–706.
- 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.
- Jin, K., Galvan, V., Xie, L., Mao, X.O., Gorostiza, O.F., Bredesen, D.E., Greenberg, D.A., 2004. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPsw,Ind) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13363–13367.
- Jing, Y., Wang, Z., Song, Y., 2004. Quantitative study of aluminum-induced changes in synaptic ultrastructure in rats. *Synapse* 52, 292–298.
- Kawahara, M., 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* 8, 171–182 discussion 209–115.
- Kawarabayashi, T., Younkin, L.H., Saido, T.C., Shoji, M., Ashe, K.H., Younkin, S.G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 372–381.
- Kempermann, G., 2008. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends Neurosci.* 31, 163–169.
- Kim, K., 2003. Perinatal exposure to aluminum alters neuronal nitric oxide synthase expression in the frontal cortex of rat offspring. *Brain Res. Bull.* 61, 437–441.
- King, D.L., Arendash, G.W., 2002. Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol. Behav.* 75, 627–642.
- King, D.L., Arendash, G.W., Crawford, F., Sterk, T., Menendez, J., Mullan, M.J., 1999. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 103, 145–162.
- Klingner, M., Apelt, J., Kumar, A., Sorger, D., Sabri, O., Steinbach, J., Scheunemann, M., Schliebs, R., 2003. Alterations in cholinergic and non-cholinergic neurotransmitter receptor densities in transgenic Tg2576 mouse brain with beta-amyloid plaque pathology. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21, 357–369.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V., 2007. Human health risk assessment for aluminum, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 10 (Suppl 1), 1–269.
- Kumar, S., 1998. Biphasic effect of aluminium on cholinergic enzyme of rat brain. *Neurosci. Lett.* 248, 121–123.
- Lalonde, R., Lewis, T.L., Strazielle, C., Kim, H., Fukuchi, K., 2003. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.* 977, 38–45.
- McLachlan, D.R., Bergeron, C., Smith, J.E., Boomer, D., Rifat, S.L., 1996. Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology* 46, 401–405.
- Miu, A.C., Andreescu, C.E., Vasii, R., Olteanu, A.I., 2003. A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *Int. J. Neurosci.* 113, 1197–1211.
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47–60.
- Polizzi, S., Pira, E., Ferrara, M., Bugiani, M., Papaleo, A., Albera, R., Palmi, S., 2002. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 23, 761–774.
- Praticò, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J.* 16, 1138–1140.
- Richardson, J.A., Burns, D.K., 2002. Mouse models of Alzheimer's disease: a quest for plaques and tangles. *ILAR J.* 43, 89–99.
- Rifat, S.L., Eastwood, M.R., McLachlan, D.R., Corey, P.N., 1990. Effect of exposure of miners to aluminium powder. *Lancet* 336, 1162–1165.
- Rodella, L.F., Ricci, F., Borsani, E., Stacchiotti, A., Foglio, E., Favero, G., Rezzani, R., Mariani, C., Bianchi, R., 2008. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol. Histopathol.* 23, 433–439.
- Roig, J.L., Fuentes, S., Teresa Colomina, M., Vicens, P., Domingo, J.L., 2006. Aluminum, restraint stress and aging: behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology* 218, 112–124.
- Saiyed, S.M., Yokel, R.A., 2005. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Addit. Contam.* 22, 234–244.
- Savory, J., Huang, Y., Herman, M.M., Reyes, M.R., Wills, M.R., 1995. Tau immunoreactivity

- associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. *Brain Res.* 669, 325–329.
- Savory, J., Herman, M.M., Ghribi, O., 2006. Mechanisms of aluminum-induced neurodegeneration in animals: implications for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 10, 135–144.
- Szutowicz, A., 2001. Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 1009–1018.
- Trombley, P.Q., 1998. Selective modulation of GABA<sub>A</sub> receptors by aluminum. *J. Neurophysiol.* 80, 755–761.
- Vorhees, C.V., Williams, M.T., 2006. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1, 848–858.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–497.
- 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.
- Wolff, M., Benhassine, N., Costet, P., Segu, L., Buhot, M.C., 2004. Interaction between the nature of the information and the cognitive requirement of the task in problem solving in mice. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 21, 289–300.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Henrikson, R.L., Gurney, M.E., 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402, 533–537.
- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H., 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660.

# **Recognition memory and $\beta$ -amyloid plaques in adult Tg2576 mice are not modified after oral exposure to aluminum**

**Short title: Tg2576 exposed to Al**

Diana Ribes, PhD Student,<sup>a,b</sup> Margarita Torrente, PhD,<sup>a,b, 1</sup> Paloma Vicens, PhD,<sup>a,b</sup> M. Teresa Colomina, PhD,<sup>a,b</sup> Mercedes Gómez, PhD,<sup>b</sup> and José L. Domingo, PhD,<sup>b</sup>

*<sup>a</sup>Department of Psychology and Research Center for Behavioral Assessment (CRAMC), Universitat “Rovira i Virgili” Sescelades Campus, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain; and*

*<sup>b</sup>Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat “Rovira i Virgili” Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Catalonia, Spain*

<sup>1</sup>Corresponding author:

Margarita Torrente  
Psychobiology Unit, Department of Psychology, Universitat “Rovira i Virgili”  
Sescelades Campus, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain  
Tel: +34 977 558079  
Fax: +34 977 558000  
E-mail: [margarita.torrente@urv.cat](mailto:margarita.torrente@urv.cat)

## **Acknowledgements**

The present research was supported by the “Fondo de Investigación Sanitaria-FIS” through grant number PI041673.



## **ABSTRACT**

The role of aluminum (Al) in Alzheimer's disease (AD) is highly controversial. However, this element has been detected in neuritic plaques and neurofibrillary tangles in AD patients. Its presence in neuritic plaques in hippocampus is especially relevant, as this is an area closely related to spatial learning and memory. In the present study, the diet of wild-type and Tg2576 mice (animals overexpressing the human amyloid precursor protein APP) was supplemented with Al lactate (1 mg/g). General neurotoxic Al effects were evaluated using a functional observational battery (FOB), as well as a novel object recognition task (NOR). Four experimental groups were used: Control-wild, Al-wild, Control-Tg and Al-Tg mice. The results show a decreased home-cage activity and an increase in piloerection in all Al-exposed animals, as well as an increased sensorimotor reactivity in Tg2576 mice given Al. Neither Al treatment nor genotype has any noticeable effect on corticosterone levels and Al concentrations in frontal cortex and cerebellum of the mice. Recognition memory was impaired in Tg2576 mice, while  $\beta$ -amyloid plaque depositions were observed in all these animals. However, Al did not alter the recognition memory and  $\beta$ -amyloid plaque loads of Tg2576 mice.

**Keywords:** Tg2576 mice, aluminum, functional observational battery, novel object recognition,  $\beta$ -amyloid, corticosterone

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a progressive mental deterioration manifested by memory loss, inability to calculate, visiospatial disturbances, confusion and disorientation. The neuropathological characteristics include cortical and subcortical atrophy, formation of intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs), deposition of  $\beta$ -amyloid peptide in neuritic or senile plaques, loss of synaptic function, oxidative stress, and apoptosis leading to neuronal loss<sup>1</sup>. An important hypothesis on AD etiology is the amyloid cascade. Neurodegeneration in AD begins with the abnormal processing of the amyloid precursor protein (APP), resulting in overproduction, aggregation, and deposition of  $\beta$ -amyloid peptide. Apparently, the amyloid cascade may facilitate NFT formation and cell death<sup>2</sup>. Hereditary early onset of AD (approximately 5-20% of cases) has been related to genes located in chromosomes 1, 14, and 21. The main constituent of senile plaques is the  $\beta$ -amyloid peptide, which is a natural product of the metabolism of APP encoded in a gene of the chromosome 21<sup>3</sup>. These events are mainly observed in the hippocampal and cortical regions of AD brains. Although the etiological factors of AD are not clearly known yet, there are a number of factors (i.e., head trauma, oxidative stress, infectious agents, and environmental factors such as arsenic or chronic aluminum (Al) exposure) that may contribute to precipitate or accelerate AD pathology<sup>1, 4, 5</sup>. A number of epidemiological, neuropathological and biochemical studies have suggested a possible link between Al neurotoxicity and the pathogenesis of AD<sup>6-8</sup>.

Aluminum is a metal widely used in cooking utensils, decorations, fencing, highway signs, cans, food packaging, foil, dental crowns and dentures, etc.<sup>9</sup>. Traditionally, Al had been considered virtually innocuous to humans. However, in recent decades it was shown that this element might be toxic to plants, animals and humans<sup>10-13</sup>. Usually, human Al exposure is primarily through the diet, being the typical adult's dietary intake around 3-12 mg Al/day<sup>14</sup>.

Aluminum lactate is often used as a representative Al soluble salts, with enhanced gastrointestinal absorption<sup>15</sup>. The distribution of the metal in different target organs varies with the route, dose, and duration of exposure. Independently on the exposure route, the brain is an important organ of Al accumulation, with the gray matter containing about twice the concentration found in white matter<sup>16</sup>.

On the other hand, an increase in plasma cortisol levels has been reported in AD patients<sup>17-20</sup>. In longitudinal studies of these subjects, increased plasma cortisol levels have been correlated with a faster cognitive decline<sup>21</sup>.

As a result of human genetic analyses, transgenic mice with APP mutations have been generated. The brains of several APP-transgenic mouse lines contain neuritic  $\beta$ -amyloid plaques. In particular, the Tg2576 transgenic mouse (APP<sub>SWE</sub>) with the Swedish mutation<sup>22</sup> of the neuron-specific 695 amino acid isoform driven by the hamster PrP promoter<sup>23</sup>, has been one of the most investigated. Moreover, the APP<sub>SWE</sub> model approximates the clinical picture of AD with respect to impaired spatial learning in the Morris water maze<sup>23, 24</sup>.

Taking the above into account, the main goal of the present study was to evaluate the behavioral effects of a low dose of Al lactate given orally to a normal population (wild-type) and a vulnerable population (Tg2576) of mice, as well as the Al influence on the general state and memory. The number of  $\beta$ -amyloid plaques, the serum corticosterone levels, and Al accumulation in cerebellum and frontal cortex were also assessed.

## **METHODS**

### **Animals and treatment**

Seventeen Tg2576 male mice and 15 wild-type control mice (six-month old, 25-30 g) provided by Taconic Europe (Denmark) were used. Animals were quarantined for seven days after shipping and individually housed in plastic cages (28 × 28 cm) in an animal room, which was maintained at a temperature of 22 ± 2°C, with a

relative humidity of  $50 \pm 10\%$ , and a 12-h light/dark automatic light cycle (light: 8:00 AM to 8:00 PM). All animals were allowed free access to rodent chow (Harlan, Barcelona, Spain) and tap water. Wild-type and Tg2576 mice received a standard rodent chow diet (Harlan, Barcelona, Spain), or the same diet supplemented with Al lactate at 1 mg Al lactate/g for 120 days. Experimental groups ( $n = 7-8$ ) were distributed as follows: control-wild (Control-W), Al-treated wild (Al-W), control-transgenic (Control-Tg) and Al-treated transgenic (Al-Tg) mice. The use of animals and the experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, Catalonia, Spain).

### **Behavioral assessment**

At nine months of age, and after three months of Al exposure, a functional observational battery (FOB) was used to assess the general state of the mice. A novel object recognition test (NOR) was subsequently used to evaluate the memory. Behavioral tests were conducted during two consecutive days (between 09:00 AM and 11:00 AM), under conditions of a 12-h light cycle in an isolated and restricted-access room, by two trained observers, who were blinded to the treatment level of the mice until the entire study was completed. After behavioral testing, Al levels in cerebellum and frontal cortex, serum corticosterone levels, as well as the presence of  $\beta$ -amyloid plaques were determined.

### **Functional observational battery (FOB)**

The FOB protocol consisted of 18 endpoints that evaluated the activity and excitability, neuromuscular and autonomic effects, and sensorimotor reactivity of the central nervous system (CNS)<sup>25-27</sup>. Following a brief assessment of the mice in their home cages (activity, rearing, eating, climbing, stereotypy, grooming, and abnormal movements), each animal was removed and held on the observer's hand for scoring ease of removal, handling reactivity, and general appearance. Each

mouse was then placed in an exploratory white box (60 x 90 cm), where the observer analyzed CNS activity (arousal, rearing), autonomic effects (urination, defecation), muscle tone/equilibrium (gait, mobility, righting reflex, inverted screen), and sensorimotor reactivity (approach response, click response, touch response)<sup>28</sup>. Data were recorded on standardized sheets. Gait condition was scored on a scale between one (normal gait) and eight. Scores higher than one indicated abnormalities (i.e., ataxia, splayed hindlimbs, feet markedly pointing outward from body, forelimb drag, walking on tiptoes, hunched body, and body drag). Gait abnormality was rated on a gradient scale from one (normal) to four (severely abnormal)<sup>26, 28</sup>.

### **Novel object recognition (NOR)**

The NOR test procedure consisted of three phases: habituation, training and retention. Each mouse was individually habituated to the box (60 cm x 90 cm x 30 cm) with 10 min of exploration in the absence of objects in Session 1 (habituation). In Session 2 (training), four objects (A1, yellow adhesive tape; A2, glass bottle; A3, yellow plastic; and A4, white cork) were symmetrically placed 11 cm from the wall. The mouse was placed in the box at an equal distance from each of the four objects and video-recorded for 5 min (sample phase). In Session 3 (training), mice were placed in the box for 5 min, with the objects located at the same positions as in Session 2. In Session 4 (retention), 24 h after the last training session, the second object (A2) was replaced by a white plug. The box and objects were cleaned with 50% ethanol for each mouse and trial, in order to prevent the build-up of olfactory cues. Animals were video-recorded (EthoVision<sup>®</sup> program, Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands) and the number of bolus, number of rearings, distance traveled, and total time spent exploring each of the four objects in each session were recorded<sup>29</sup>. Before the performance of this NOR test, a pilot study was carried out to assess no statistically significant preference object through the objects used in NOR by wild-type mice (data not shown).

### **Aluminum analysis**

After behavioral testing, animals were deeply anesthetized with tribromoethanol and sacrificed by decapitation, being the brains rapidly removed. Cerebellum and frontal cortex were weighed in a microsampling quartz insert and 65% nitric acid (Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) was added to digest the samples. The microsampling inserts were then placed in Teflon vessels, which were put into a Star D microwave oven (Milestone, Sorisole, Italy) for 30 min at 185°C and 1000 W according to the manufacturer's instructions. The digested sample was diluted to 5 ml with Milli-Q water. To avoid contamination, all materials were previously washed with 10% nitric acid. For quality control, brain (prepared in-house) and NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA) were measured in each assay. Aluminum concentrations were determined by means of a computer-controlled sequential inductively-coupled plasma spectrometer (PerkinElmer Elan 6000) according to DIN EN ISO 17294-2<sup>30</sup>. The detection limit was 1.00 µg/kg.

### **Corticosterone analysis**

After sacrifice of the mice, blood was collected (between 09:00 AM and 11:00 AM). Serum samples were prepared and stored at -20°C for corticosterone analysis. Animals were not subjected to any stressful condition before blood collection. Corticosterone levels in serum were measured by duplicate using a RIA kit (ICN Biomedical Inc., Costa Mesa, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The dynamic range of the kit of the assay was 25–1000 ng/ml.

### **β-amyloid plaque quantification**

It is well established that Tg2576 mice develop amyloid plaques<sup>31</sup>. Therefore, an exploratory quantification of Aβ deposit in brain was conducted in these animals to examine any changes due to Al exposure. One of every six sections (a total of ten

coronal sections per mouse) was taken for double immunofluorescence staining for A $\beta$  and also for GFAP labeling, to confirm amyloid plaques. The sections were rinsed in TBS and inactivated for endogen peroxidase activity in 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TBS. Sections were blocked in TBS-plus containing 3% normal goat serum and 1% Triton-X in TBS for 30 min. The antibodies monoclonal anti-A $\beta$  (1:500, Sigma, Saint Louis, USA) and GFAP (1:250, Sigma, Saint Louis, USA) with blocking buffer were incubated for 48 h at 4°C. To detect  $\beta$ -amyloid plaques and GFAP (Alexa Fluor 568 and 660; Fisher Bioblock Scientific, Madrid, Spain), a cocktail of secondary antibodies (1:250) was applied for 4 h at room temperature. Sections were again washed, mounted and coverslipped. The total number of A $\beta$  deposit was counted in parietal and temporal cortex surrounding hippocampus, and in the hippocampus of each animal. The total number of plaques in the entire hippocampus was exhaustively counted in one out of 6 serial coronal sections of the brain. The set of selected sections represents one-sixth of the whole hippocampus, being representative of the total hippocampus, and one-sixth of the whole parietal and temporal cortex. Plaques were counted by means of Nikon T2000E laser-scanning confocal microscopy. Those in the uppermost focal plane were discarded to avoid counting twice plaques cut in two parts<sup>32</sup>. The estimation of the total number of plaques was obtained by multiplying the total number counted by 6, being reported as total number of plaques.

## Statistics

Results were analyzed by two-way (Al  $\times$  genotype) analyses of variance (ANOVA), and with a two-way ANOVA for repeated measures when appropriate, using the period of time, or the day of evaluation as repeated measures. To assess differences between groups, one-way ANOVA and DMS post-hoc analyses for multiple comparisons were performed. Levene's test was used to determine variance homogeneity. In case of heterogeneity of variance ( $P < 0.05$ ), non-parametric tests (Kruskal-Wallis test or Mann-Whitney  $U$ -test) were used.

Bonferroni correction was used to account for multiple comparisons (Mann-Whitney  $U$ -test)<sup>33</sup>. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Functional observational battery

A total of eighteen parameters were scored to assess abnormal behavior, which would indicate central, autonomic or peripheral nervous system dysfunction.

--Climbing: A two-way ANOVA showed a significant AI effect [ $F(1,32)=8.724$ ,  $P=0.006$ ]. However, no effects of genotype or AI  $\times$  genotype interactions were observed. The Kruskal-Wallis test revealed significant differences between groups [ $X^2=7.990$ ,  $P=0.046$ ], while the Mann-Whitney  $U$ -test showed a lower activity in the AI-exposed transgenic group than in the wild-type control group (Fig. 1A).

--Eating/drinking: A two-way ANOVA (AI  $\times$  genotype) showed neither effects of AI or genotype, nor an AI  $\times$  genotype interaction. The Kruskal-Wallis test revealed significant differences between groups [ $X^2=9.120$ ,  $P=0.028$ ]. In turn, the Mann-Whitney  $U$ -test showed a significant lower activity in AI-exposed and in control Tg2576 animals, than in control wild-type mice (Fig. 1B).

--Sensorimotor reactivity (click response): A two-way ANOVA revealed an overall effect of genotype [ $F(1,32)=4.582$ ,  $P=0.041$ ] and an AI  $\times$  genotype interaction [ $F(1,32)=7.242$ ,  $P=0.012$ ]. Significant differences between groups were also noted [ $X^2=9.222$ ,  $P=0.026$ ]. The Mann-Whitney  $U$ -test revealed an increased reactivity in the AI-exposed transgenic group when compared to the AI-treated wild-type and control transgenic mice (Fig. 1C).

--Piloerection: A two-way ANOVA revealed an overall effect of AI [ $F(1,32)=10.702$ ,  $P=0.003$ ]. No effect of genotype or an AI  $\times$  genotype interaction was noted. The Kruskal-Wallis test showed significant differences between groups [ $X^2=9.171$ ,  $P=0.027$ ], while the Mann-Whitney  $U$ -test revealed a significant increase in piloerection in the groups exposed to AI in comparison to the control groups (wild-type and transgenic mice) (Fig. 1D).



All these parameters were not affected by body weight.

-----Insert Fig.1 about here-----

### **Novel object recognition**

*Session 1 (habituation):* In order to establish a basal line of mice behavior through experimental groups in the exploratory box, an habituation session before training sessions was conducted. Total time in the center of the open-field was analyzed by a two-way ANOVA (AI × genotype). A significant effect of AI [ $F(1,29)=4.270$ ,  $P=0.049$ ] was observed. However, no effects of either genotype or interaction between genotype and AI treatment were noted. A two-way ANOVA revealed an overall effect of genotype [ $F(1,29)=6.839$ ,  $P=0.014$ ] on the total number of rearings in the exploratory box. No effects of, AI or an AI × genotype interaction, were found. Significant differences between groups were detected [ $F(3,29)=3.975$ ,  $P=0.019$ ] in the total number of rearings (Fig. 2A). Both, the AI-treated groups and the Tg2576 control group, showed more rearings than the control wild-type group. These results indicate that basal line in rearings is increased in these groups in the exploratory box. No other differences were found in the remaining analyzed parameters.

To evaluate habituation effects, the 10 min period was divided into fractions of 5 min. A two-way ANOVA (AI × genotype) for repeated measures was performed to examine the total distance traveled. Although an habituation to the open-field was observed [ $F(1,26)= 13.645$ ,  $P<0.001$ ], no group-based effect was detected in any fraction of time (Fig. 2B). Therefore, any future difference could not be due to differences in habituation through experimental groups.

*Session 2 (training):* A two-way ANOVA (AI × genotype) analysis showed a significant effect of AI [ $F(1,32)=5.268$ ,  $P=0.029$ ] on the number of rearings. A significant effect of genotype was also observed on the number of rearings [ $F(1,32)=5.974$ ,  $P=0.021$ ], on the number of bolus [ $F(1,32)=7.275$ ,  $P=0.012$ ] and on the time spent exploring the objects [ $F(1,32)=6.413$ ,  $P=0.017$ ].

*Session 3 (training):* A two-way ANOVA (AI × genotype) analysis showed a significant effect of genotype on the number of bolus [ $F(1,32)=20.613$ ,  $P<0.001$ ] and on the time spent exploring the objects [ $F(1,32)=5.533$ ,  $P=0.026$ ].

*Session 4 (retention):* A two-way ANOVA (AI × genotype) analysis showed a significant effect of AI on the number of rearings [ $F(1,32)=6.236$ ,  $P=0.018$ ]. A significant effect of genotype was also observed on the time spent in the arena with the second object [ $F(1,32)=5.314$ ,  $P=0.029$ ] (Fig. 2C), as well as on the number of rearings [ $F(1,32)=5.963$ ,  $P=0.021$ ]. Significant differences between groups were found [ $F(3,32)=5.387$ ,  $P=0.005$ ] in the total number of rearings, with the treated Tg2576 group showing more rearings than the remaining three groups.

In general terms, it was found that Tg2576 mice spent less time exploring the new object than animals from the wild-type control group, while AI-exposed Tg2576 mice tended to show more rearings than animals from the other groups.

-----**Insert Fig.2 about here**-----

### **Aluminum concentrations**

Data on AI accumulation in cerebellum and frontal cortex were statistically evaluated by means of a two-way ANOVA (AI × genotype). No significant effects of these factors were found in AI concentrations in cerebellum or in frontal cortex. A one-way ANOVA analysis did not show significant differences between groups (Fig. 3).

-----**Insert Fig.3 about here**-----

### **Corticosterone levels**

The statistical significance of the corticosterone levels was evaluated by means of a two-way ANOVA (AI × genotype). No effects of these factors were noted (Fig. 4).

-----**Insert Fig.4 about here**-----

### **β-amyloid plaque quantification**

Because wild-type mice did not show any  $\beta$ -amyloid plaque, comparisons were only made between Al-exposed transgenic mice and control transgenic animals. The differences between groups were not statistically significant (Fig. 5).

-----Insert Fig.5 about here-----

## DISCUSSION

It is well known that Al may be a potent neurotoxic agent regardless of the host, the route of administration and its speciation<sup>34-38</sup>. In the current study, the behavioral effects of dietary exposure to Al lactate (1 mg/g) were evaluated in wild-type and Tg2576 mice using FOB and NOR. The results showed that oral exposure to Al lactate induced some general signs of toxicity, piloerection and diminished home-cage activity in both, wild-type and Tg2576 mice. A greater reactivity was also observed in Al-exposed transgenic mice, suggesting that animals with the Tg2576 genotype are more sensitive to Al-induced sensorimotor effects.

We also observed piloerection, an effect observed in the intoxication by Al compounds<sup>39</sup>, and decreased climbing activity. Climbing activity has been previously described as an index of central dopaminergic function<sup>40</sup>, with Al altering the biochemical pathway involving dopamine  $\beta$ -hydroxylase<sup>41</sup>, decreasing the dopamine level in rat brains<sup>42</sup>, and reducing the density of D1 dopamine receptors (DRD1) and D2 dopamine receptors (DRD2) in a dose-dependent manner in cortex<sup>43</sup>. Further studies must be conducted to investigate if this decreasing climbing activity is related to an existent decrease in dopamine levels in this transgenic model.

NOR, a test of dorsal hippocampal function<sup>29</sup>, is based on the assumption that rodents will explore a novel object more than a familiar one, only if they remember the familiar one. The current results show that wild-type groups spent more time exploring the novel object than animals in the transgenic groups, indicating a long-term memory impairment of Tg2576 mice at nine months of age. Similar results were previously reported<sup>44, 45</sup>, indicating an impairment in event memory in Tg2576

mice. The NOR paradigm is especially well-suited to study short-term (2 min), intermediate-term (4h) and long-term memory (24 h retention interval). In a recent study <sup>46</sup>, wild-type and Tg2576 mice performed equivalently well in NOR when short retention intervals were utilized (2min). In contrast, Tg2576 mice at 5 months of age were unable to perform object recognition when the retention interval was 24 h, concluding that a synaptic dysfunction (aberrant calcineurin activity) mediated these object recognition deficits in Tg2576 animals. Previous data obtained in our laboratory <sup>47</sup>, also showed a delayed acquisition and worse retention performance of transgenic mice compared to wild-type animals in a Morris water maze, which is the most used test to assess spatial learning and memory. However, AI treatment did not impair recognition function in Tg2576 mice measured by this test.

It is well known that glucocorticoid hormones influence cognitive performance. It has been suggested that the effects of stress on memory (and high glucocorticoid levels in particular) are mediated through the influences on the hippocampus. A number of studies have consistently demonstrated that stress or stress-elevated corticosterone levels inhibit the induction of excitatory plasticity (long-term potentiation, LTP) and promote the induction of inhibitory plasticity (long-term depression, LTD) in hippocampus <sup>48-53</sup>. In the present study, we did not find higher corticosterone levels in Tg2576 mice related to a worse NOR performance. These results are not in agreement with those reported by Mostafa et al. <sup>54</sup>, who found in rats an association between an impaired NOR performance, and an increase in the corticosterone levels. This lack of association might be a consequence to the high variability in corticosterone levels.

In the current investigation,  $\beta$ -amyloid plaque deposition was only found in Tg2576 (AI-treated and non-treated) mice. The presence of  $\beta$ -amyloid plaques in the Tg2576 transgenic mouse model of AD was previously reported by Hsiao et al. <sup>23</sup>. Recently, Dong et al. <sup>18</sup> also found an increase in  $\beta$ -amyloid plaque deposition and corticosterone levels in isolated Tg2576 mice. It suggests an association between

the changes in the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), as well as increases in brain-tissue  $\beta$ -amyloid levels and  $\beta$ -amyloid plaque burden. It provides an additional support to the hypothesis that stress would accelerate  $\beta$ -amyloid plaque deposition in Tg2576 mice<sup>18</sup>. In the present study, we did not find significant differences between treated and non-treated Tg2576 mice in the number of  $\beta$ -amyloid plaques. In a previous study performed in our laboratory, Al-treated Tg2576 mice showed a decrease of  $\beta$ -amyloid levels (1-40) and (1-42), quantified by ELISA<sup>47</sup>. However, our results were not in agreement with those of Pratico et al.<sup>55</sup>, who reported that  $\beta$ -amyloid levels (1-40) and (1-42) were elevated in Tg2576 mice orally exposed to Al for nine months. To explain these differences, it must be considered that the period of exposure and the Al dose were considerably lower in our study<sup>47</sup> than in that of Pratico et al.<sup>55</sup>, being our mice also younger at the time of exposure. Further investigations should assess the outcome of an increased dose and period of exposure in older animals.

The results of the present study do not show significant differences between groups in Al accumulation in cerebellum or frontal cortex. Recently, it was also observed in cerebellum of Tg2576 and wild-type female mice<sup>30</sup>, as well as in the hippocampus of rats<sup>56</sup>. Moreover, Golub et al.<sup>15</sup> reported that the amount of Al in brains of mice dietary exposed to high-Al doses were even lower in Al-treated mice than in controls. On the other hand, Sanchez-Iglesias et al.<sup>57</sup> found that the amount of Al in brain of rats was higher after intraperitoneal Al injection than after oral Al administration, concluding that the cerebral Al distribution was dependent on the route of administration. It is accepted that there is a relationship between Al in the brain and its toxicity, which should mean that younger animals accumulate less Al suffering a lower toxicity<sup>1</sup>. As above suggested, further studies in which the number of animals, time of exposure, Al dose, and age of the animals are increased, are necessary in order to determine whether these different conditions can lead to Al accumulation.

In summary, the results of the present study show that oral exposure of Tg2576 and wild-type mice to Al lactate (1 mg/g) for three months, caused some general toxic effects, being Tg2576 animals more sensitive to Al-induced sensorimotor effects. However, no changes in the number of  $\beta$ -amyloid plaques due to Al exposure were observed. Our results also demonstrate that the Tg2576 transgenic mouse (APP<sub>SWE</sub>) with the Swedish mutation, at nine-months of age shows deficits in recognition memory that are correlated with the presence of  $\beta$ -amyloid plaques<sup>23, 24, 58, 59</sup>.

### Acknowledgements

The present research was supported by the "Fondo de Investigación Sanitaria FIS" through grant number PI041673.

### REFERENCES

1. Gupta VB, Anitha S, Hegde ML, et al. Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:143-158.
2. Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, et al. Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease. *Brain Res Rev.* 2004;47:275-289.
3. Gra S, Padrón N, Llibre JJ. Péptido beta amiloide, proteína tau y enfermedad de alzheimer. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2002;21:253-261 (in Spanish).
4. Gong G, O'Bryant S E. The Arsenic Exposure Hypothesis for Alzheimer Disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2010;24:311-316.
5. Dunn N, Mullee M, Perry VH, et al. Association between dementia and infectious disease: evidence from a case-control study. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2005;19:91-94.
6. Kawahara M, Kato M, Kuroda Y. Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of beta-amyloid protein. *Brain Res Bull.* 2001;55:211-217.
7. Rodella LF, Ricci F, Borsani E, et al. Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol Histopathol.* 2008;23:433-439.
8. Becaria A, Lahiri DK, Bondy SC, et al. Aluminum and copper in drinking water enhance inflammatory or oxidative events specifically in the brain. *J Neuroimmunol.* 2006;176:16-23.
9. ATSDR. Toxicological Profile for Aluminum. In: Services USDoHaH, ed. *Public Health Services.* Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology and Environmental Medicine/Applied Toxicology Branch; 2008.

10. Panda SK, Baluska F, Matsumoto H. Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signal Behav.* 2009;4:592-597.
11. Fuma S, Ishii N, Takeda H, et al. Ecological effects of various toxic agents on the aquatic microcosm in comparison with acute ionizing radiation. *J Environ Radioact.* 2003;67:1-14.
12. Sinczuk-Walczak H, Szymczak M, Razniewska G, et al. Effects of occupational exposure to aluminum on nervous system: clinical and electroencephalographic findings. *Int J Occup Med Environ Health.* 2003;16:301-310.
13. Sinczuk-Walczak H, Matczak W, Razniewska G, et al. [Neurologic and neurophysiologic examinations of workers occupationally exposed to aluminium]. *Med Pr.* 2005;56:9-17 (in Polish).
14. Saiyed SM, Yokel RA. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Addit Contam.* 2005;22:234-244.
15. Golub MS, Germann SL, Han B, et al. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology.* 2000;150:107-117.
16. Nayak P. Aluminum: impacts and disease. *Environ Res.* 2002;89:101-115.
17. Weiner MF, Vobach S, Olsson K, et al. Cortisol secretion and Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry.* 1997;42:1030-1038.
18. Dong H, Yuede CM, Yoo HS, et al. Corticosterone and related receptor expression are associated with increased beta-amyloid plaques in isolated Tg2576 mice. *Neuroscience.* 2008;155:154-163.
19. Davis KL, Davis BM, Greenwald BS, et al. Cortisol and Alzheimer's disease, I: Basal studies. *Am J Psychiatry.* 1986;143:300-305.
20. Peskind ER, Wilkinson CW, Petrie EC, et al. Increased CSF cortisol in AD is a function of APOE genotype. *Neurology.* 2001;56:1094-1098.
21. Csernansky JG, Dong H, Fagan AM, et al. Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer-type dementia. *Am J Psychiatry.* 2006;163:2164-2169.
22. Mullan M, Crawford F, Axelman K, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992;1:345-347.
23. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996;274:99-102.
24. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, et al. The relationship between A $\beta$  and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2002;22:1858-1867.
25. Sills RC, Valentine WM, Moser V, et al. Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol Pathol.* 2000;28:142-148.
26. Franco-Pons N, Torrente M, Colomina MT, et al. Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicol Lett.* 2007;169:205-213.
27. Herr DW, Graff JE, Moser VC, et al. Inhalational exposure to carbonyl sulfide produces altered brainstem auditory and somatosensory-evoked potentials in Fischer 344N rats. *Toxicol Sci.* 2007;95:118-135.
28. Golub MS, Germann SL, Lloyd KC. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res.* 2004;153:159-170.
29. de Lima MN, Luft T, Roesler R, et al. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett.* 2006;405:142-146.

30. Gomez M, Esparza JL, Cabre M, et al. Aluminum exposure through the diet: metal levels in AbetaPP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Toxicology*. 2008;249:214-219.
31. Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, et al. Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2002;22:6331-6335.
32. Encinas JM, Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol*. 2008;85:243-272.
33. Markgraf CG, Cirino M, Meredith J. Comparison of methods for analysis of functional observation battery (FOB) data. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2010;62:89-94.
34. Strong MJ, Garruto RM, Joshi JG, et al. Can the mechanisms of aluminum neurotoxicity be integrated into a unified scheme? *J Toxicol Environ Health*. 1996;48:599-613.
35. Kilburn KH. Neurobehavioral impairment and symptoms associated with aluminum remelting. *Arch Environ Health*. 1998;53:329-335.
36. Yokel RA. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*. 2000;21:813-828.
37. Bondy SC. The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *Neurotoxicology*. 2010;31:575-581.
38. Klein GL. Aluminum: new recognition of an old problem. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5:637-640.
39. Llobet JM, Domingo JL, Gomez M, et al. Acute toxicity studies of aluminium compounds: antidotal efficacy of several chelating agents. *Pharmacol Toxicol*. 1987;60:280-283.
40. Xu H, Yang HJ, Zhang Y, et al. Behavioral and neurobiological changes in C57BL/6 mice exposed to cuprizone. *Behav Neurosci*. 2009;123:418-429.
41. Milanese M, Lkhayat MI, Zatta P. Inhibitory effect of aluminum on dopamine beta-hydroxylase from bovine adrenal gland. *J Trace Elem Med Biol*. 2001;15:139-141.
42. Wenk GL, Stemmer KL. The influence of ingested aluminum upon norepinephrine and dopamine levels in the rat brain. *Neurotoxicology*. 1981;2:347-353.
43. Kim S, Nam J, Kim K. Aluminum exposure decreases dopamine D1 and D2 receptor expression in mouse brain. *Hum Exp Toxicol*. 2007;26:741-746.
44. Good MA, Hale G, Staal V. Impaired "episodic-like" object memory in adult APPswe transgenic mice. *Behav Neurosci*. 2007;121:443-448.
45. Ognibene E, Middei S, Daniele S, et al. Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2005;156:225-232.
46. Tagliabattola G, Hogan D, Zhang WR, et al. Intermediate- and long-term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition. *Behav Brain Res*. 2009;200:95-99.
47. Ribes D, Colomina MT, Vicens P, et al. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2008;214:293-300.
48. Foy MR, Stanton ME, Levine S, et al. Behavioral stress impairs long-term potentiation in rodent hippocampus. *Behav Neural Biol*. 1987;48:138-149.
49. Diamond DM, Bennett MC, Fleshner M, et al. Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*. 1992;2:421-430.



50. Pavlides C, Watanabe Y, McEwen BS. Effects of glucocorticoids on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus*. 1993;3:183-192.
51. Xu L, Holscher C, Anwyl R, et al.. Glucocorticoid receptor and protein/RNA synthesis-dependent mechanisms underlie the control of synaptic plasticity by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3204-3208.
52. Akirav I, Richter-Levin G. Biphasic modulation of hippocampal plasticity by behavioral stress and basolateral amygdala stimulation in the rat. *J Neurosci*. 1999;19:10530-10535.
53. Maroun M, Richter-Levin G. Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway in vivo. *J Neurosci*. 2003;23:4406-4409.
54. Mostafa RM, Mostafa YM, Ennaceur A. Effects of exposure to extremely low-frequency magnetic field of 2 G intensity on memory and corticosterone level in rats. *Physiol Behav*. 2002;76:589-595.
55. Pratico D, Uryu K, Sung S, et al. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J*. 2002;16:1138-1140.
56. Sakamoto T, Ogasawara Y, Ishii K, et al. Accumulation of aluminum in ferritin isolated from rat brain. *Neurosci Lett*. 2004;366:264-267.
57. Sanchez-Iglesias S, Soto-Otero R, Iglesias-Gonzalez J, et al. Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. *J Trace Elem Med Biol*. 2007;21:31-34.
58. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, et al. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid  $\beta$  protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001;21:372-381.
59. Irizarry M, McNamara M, Fedorchack K, et al. APPsw transgenic mice develop age-related A $\beta$  deposits and neurophil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;56:965-973.

**Figure 1**

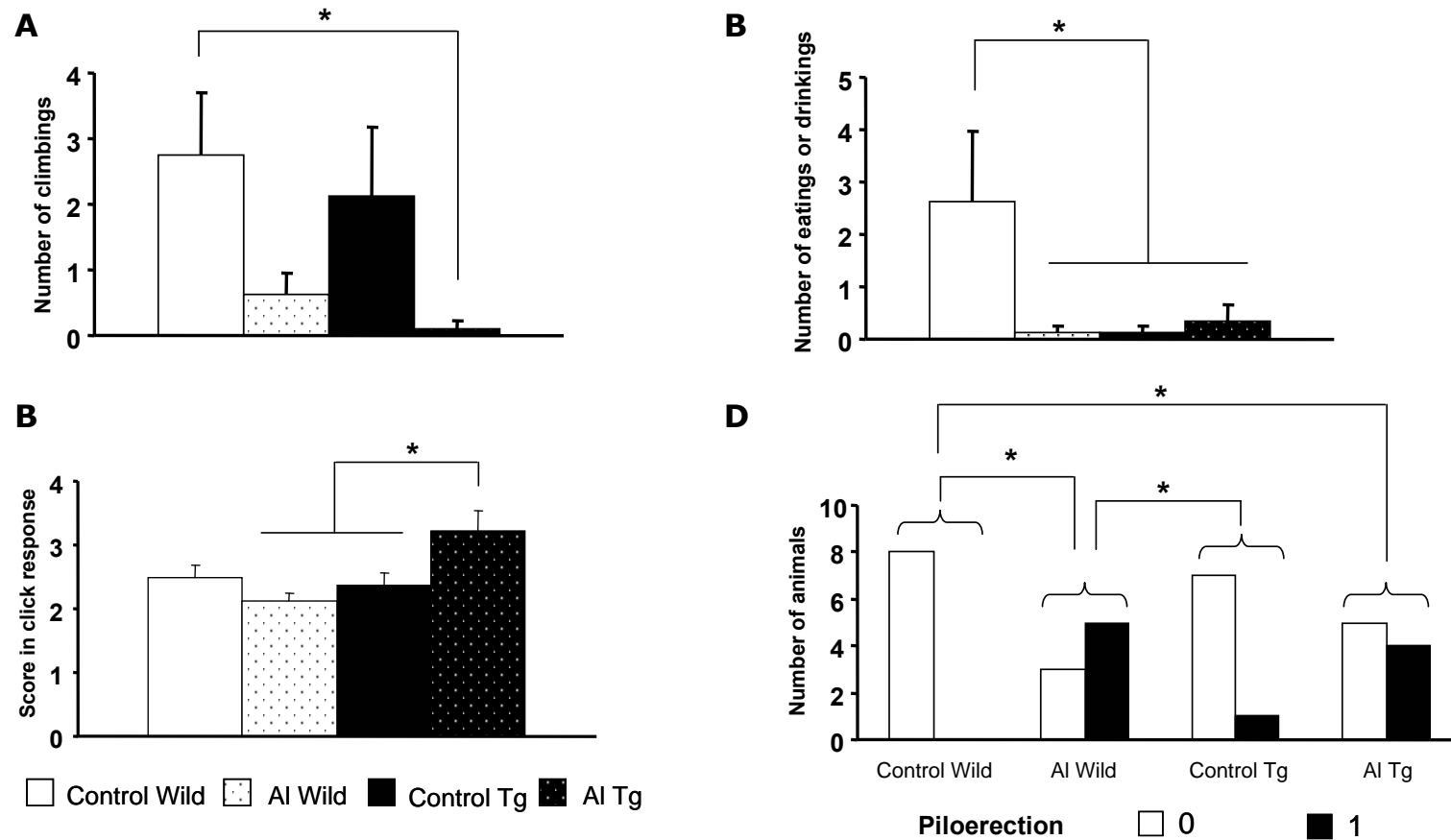


Figure 1. Results in the functional observational battery (FOB). Figures A, B and C show mean values  $\pm$  S.E.M in punctuation of climbing, eating and drinking, and click response respectively. Figure D shows the number of animals suffering piloerection (1) (or not, 0) in each group. An asterisk indicates significant ( $P < 0.05$ ) differences between groups.

**Figure 2**

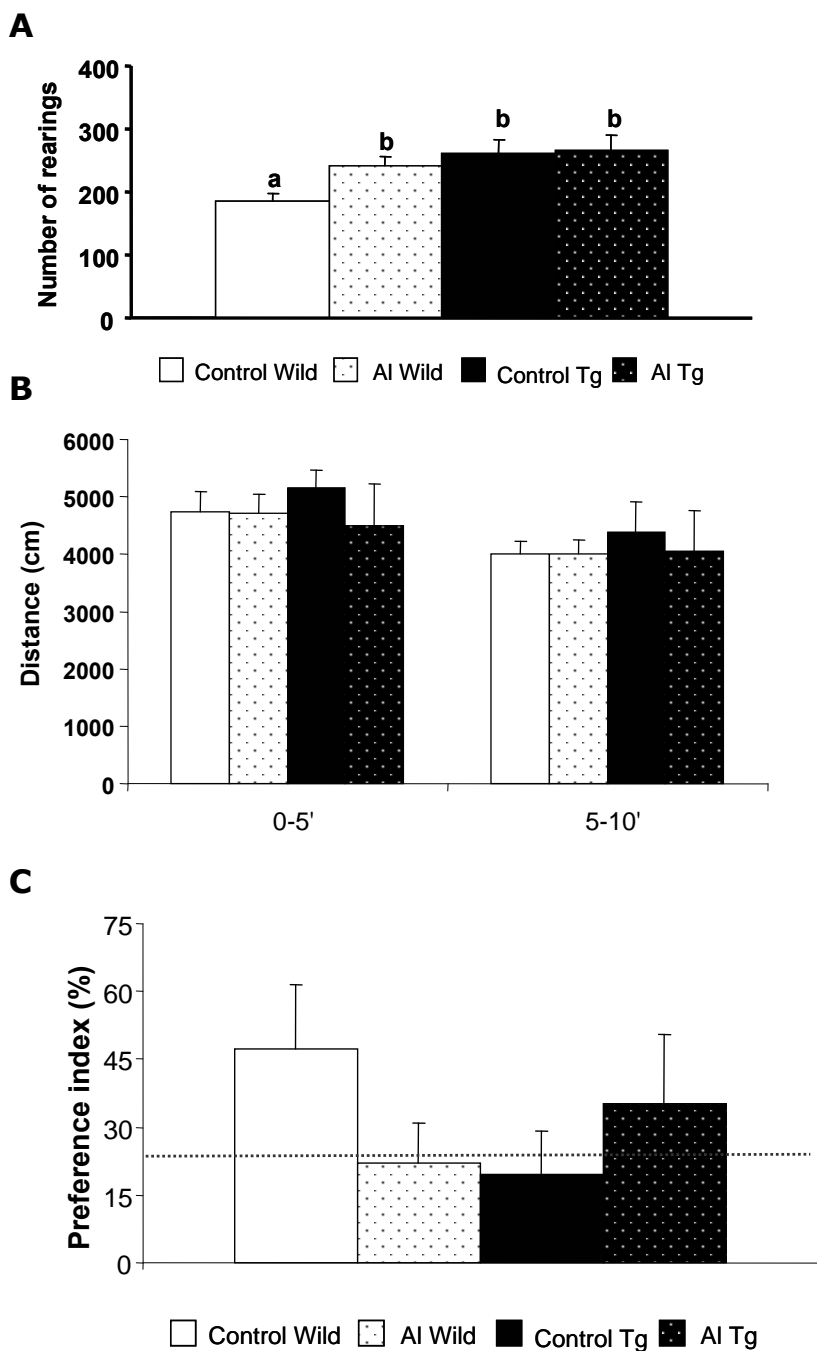


Figure 2. Results in the novel object recognition test (NOR). Figures A and B show data obtained on session 1 (habituation) in the number of rearings (A), and in distance traveled over 10 min (B), respectively. Figure C shows preference index (percentage of time exploring the novel object, related to the total time for four objects) on session 4 (retention). Horizontal dotted line represents equal exploration of four objects. Different letters (a,b,c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between groups. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M.

**Figure 3**

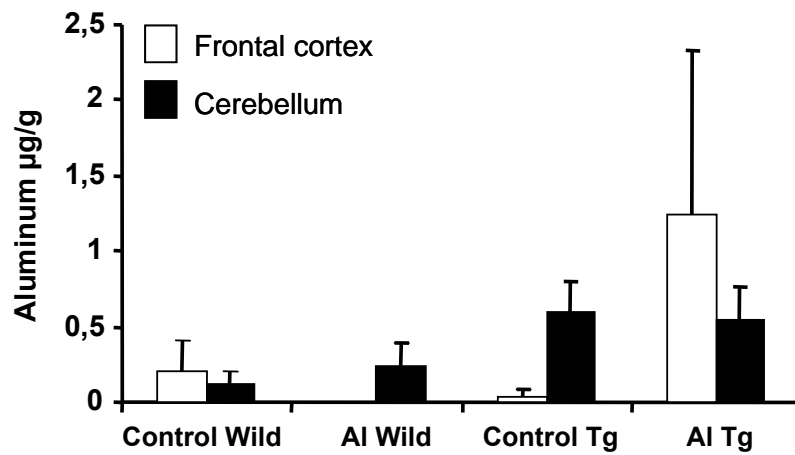


Figure 3. Aluminum levels in frontal cortex and cerebellum. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M.

**Figure 4**

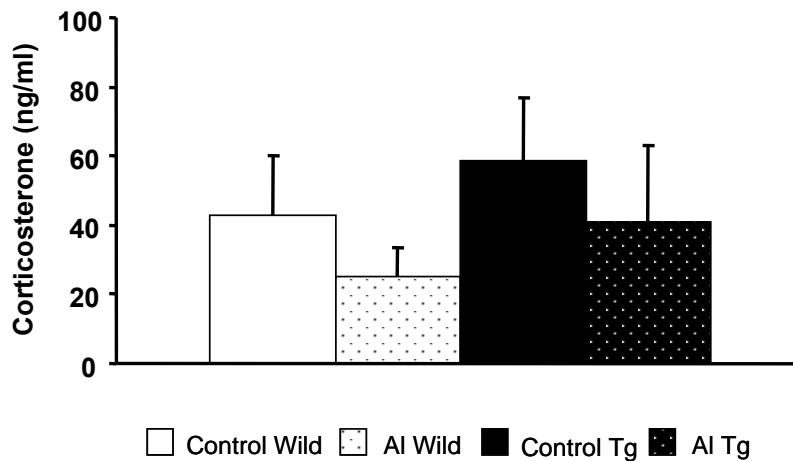


Figure 4. Serum corticosterone levels. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M.

**Figure 5**

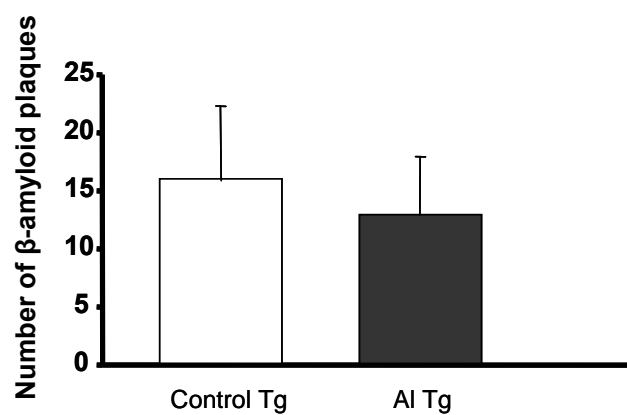


Figure 5. Mean number of plaques per group of  $\beta$ -amyloid plaque quantification in Tg2576 mice. Data are expressed as mean values  $\pm$  S.E.M.

## 4.2 Fase experimental II

En la segona fase experimental es va incrementar la dosi d'Al administrada via oral i el temps d'exposició. Per tant, es va avaluar l'exposició prolongada durant sis mesos a 11 mg/g de lactat d'Al en animals transgènics i *wild* de cinc mesos d'edat. En aquest cas, com en la fase anterior, vam observar efectes tòxics generals de l'Al mitjançant la bateria d'observació funcional, l'activitat motora amb el test del camp obert, l'ansietat amb la caixa de dos compartiments i l'aprenentatge i la memòria en el laberint aquàtic de Morris. Aquestes dades es van complementar amb resultats bioquímics procedents de l'estudi neurogènic, de la  $\beta$ -amiloide (nivells de proteïna i número de plaques) i de l'acumulació d'Al al cervell.

Els resultats indiquen un increment de l'ansietat i de l'activitat induïda per l'exposició prolongada a 11 mg/g de lactat d'Al en tots dos grups exposats al metall.

Pel que fa a l'aspecte cognitiu, els grups de ratolins transgènics mostren dèficits cognitius en el laberint aquàtic de Morris. Com en la fase experimental anterior, trobem un efecte diferencial de l'Al segons la vulnerabilitat genètica dels ratolins, aquest efecte, però, desapareix quan s'avalua la memòria ja que s'observa un deteriorament de la mateixa independentment de la càrrega genètica dels animals.

Els ratolins transgènics presentaren nivells elevats de proteïna  $\beta$ -amiloide i del número de plaques tant a l'escorça com a l'hipocamp.



# Impaired Spatial Learning and Unaltered Neurogenesis in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease After Oral Aluminum Exposure

D. Ribes<sup>1,2</sup>, M.T. Colomina<sup>1,2</sup>, P. Vicens<sup>1,2,\*</sup> and J.L. Domingo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychology and Research Center in Behavioral Assessment (CRAMC), "Rovira i Virgili University", Sescelades Campus, 43007 Tarragona, Spain; <sup>2</sup>Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, "Rovira i Virgili University", Sant Llorens 21, 43201 Reus, Spain

**Abstract:** Although it is well established that aluminum (Al) is neurotoxic, the potential role of this element in the etiology of Alzheimer's disease (AD) is not well established. In this study, we evaluated the effects of oral Al exposure on spatial learning, memory and neurogenesis in Tg2576 mice, an animal model of AD in which Abeta plaques start to be deposited at 9 months of age. Aluminum was given as Al lactate (11 mg/g of food) for 6 months. At 11 months of age a water maze test was carried out to evaluate learning and memory. Subsequently, mice were injected with bromodeoxyuridine (BrdU) and sacrificed 24 hours or 28 days after the last injection in order to assess proliferation, survival and differentiation of neurons. We observed impaired acquisition in the water maze task in Al-treated Tg2576 mice, as well as worse memory in the Al-exposed groups. In terms of neurogenesis, no effects of aluminum were observed in proliferation, survival and differentiation. The results of this investigation suggest that Tg2576 mice fed for 210 days with rodent chow supplemented with Al lactate at 11 mg/g of food have impaired spatial learning although their neurogenesis remains unmodified.

**Keywords:** Alzheimer disease, aluminum, Tg2576 mice,  $\beta$ -amyloid, spatial learning, hippocampus, proliferation, neurobehavior.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by neuropathological signs such as  $\beta$ -amyloid depositions and neurofibrillary tangles, as well as by a cognitive deterioration of learning and memory processes.

Environmental factors, stress, age and chronic exposure to drugs, can also have a deleterious effect in AD [1-5]. A possible relationship between water Al content and AD has been suggested [6-9], and Al-exposed workers have shown impaired cognitive functions [10-12]. Aluminum has been routinely used as a water treatment reagent, often being added to food and some pharmaceutical drugs, such as antacids. Although an association between AD and exposure to Al in drinking water have recently been reported [13], oral Al exposure mainly comes from food [14]. However, only a pilot study have investigated the possible impact of this Al source on human health suggesting that dietary intake of aluminium may affect the risk of developing Alzheimer disease [15]. It has been estimated that the dietary intake of Al can be from 3 to 30 mg/day [16].

Experimental studies have shown that intracerebroventricular administration of Al to rabbits and cats induced neurofibrillary tangles [17, 18]. The availability of mutant amyloid precursor protein (APP) transgenic mice has made it possible to evaluate the potential effect of different environ-

mental factors in AD [2, 19, 20]. These mouse models develop at least some neuropathological signs of AD, and become cognitively impaired during aging. It has been demonstrated that Al is linked to Abeta deposition *in vivo* and *in vitro* [21], induces oxidative stress in the brain [22, 23], increases Abeta deposits in transgenic mice models [23], and induces neuropathological changes in brains [24-26]. However, studies using rodent models failed to establish a consistent link between cognitive impairment and Al exposure even at high Al doses, thus enhancing the controversy regarding the role of Al in lowering AD thresholds [27].

While some authors have reported that rodents are quite resistant to Al-induced neurodegeneration [28-30], other research has shown that rats injected with Al gluconate have fluctuating performances in the Morris water maze [30]. Recently, Sethi *et al.* [31] reported that Al exposure via drinking water increased anxiety and impaired spatial performance in rats by modifying brain functions at electrophysiological, biochemical and structural levels. Another study conducted with the transgenic model (Tg 2576) of AD provided evidence to link Al and AD [23].

Cumulative evidence has shown that neurogenesis persists in restricted areas of the adult brain of mammals [32, 33]. This phenomenon refers to the birth of new neural cells throughout the lifetime in areas such as the hippocampal dentate gyrus (DG). A number of factors have been shown to positive or negatively influence neurogenesis, such as environmental enrichment, reduced caloric intake, hippocampal-dependent learning, stress, and aging [34-39]. An increased neurogenesis associated with high levels of Abeta has been reported in AD patients, and in some mice models of neu-

\*Address correspondence to this author at the Department of Psychology and Research Center in Behavioral Assessment (CRAMC), "Rovira i Virgili University", Sescelades Campus, 43007 Tarragona, Spain; Tel: +34 977 759325; Fax: +34 977 759322; E-mail: paloma.vicens@urv.cat



rodegenerative processes, at early stages of the disease [40, 41]. Recently, we showed that Al impaired water maze performance in wild-type mice and increased proliferating cells in the DG. However, no effects were detected in transgenic mice probably due to either the low doses, or the rather short exposure period [42].

The purpose of the present study was to evaluate in Tg2576 mice whether a high Al intake over a prolonged period could accelerate the behavioral and spatial learning deficits previously observed, as well as to assess the effects on cell proliferation, survival and differentiation in the dentate gyrus.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Treatment

After authorization from Taconic Europe (Ejby, Denmark), AbetaPP transgenic mice were obtained by crossing Tg2576 males with C57BL6/SJL females. At 2 months of age, the transgenic status was determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) of tail DNA. Male mice were then separated into transgenic and wild-type. Twenty transgenic (Tg2576) and 20 wild control male mice were individually housed in plastic cages in an animal room, which was maintained at a temperature of  $22 \pm 2$  °C, a relative humidity of  $50 \pm 10\%$ , and a 12-h light/dark automatic light cycle (light: 08:00–20:00 h). All animals were allowed free access to a chow diet (Harlan, Barcelona, Spain) and tap water until 5 months of age. Al concentrations were measured in the normal chow (27.1 µg/g), in the supplemented chow (1107.5 µg/g) and in the tap water (14 µg/l). Once the animals had reached 5 months of age, the control mice received normal chow, while the Al-treated animals were fed for 210 days with rodent chow supplemented with Al lactate at 0 and 11 mg/g of food, which means 0 and 1.11 mg of Al/g, respectively. The experimental groups ( $n = 10$ ) were distributed as follows: control wild (Control Wild), Al-treated wild (Al Wild), control transgenic (Control Tg), and Al-treated transgenic (Al Tg) mice. Body weight, food intake, and water consumption were measured once a month during the entire treatment period. The protocols of the study were approved by the Animal Care and Use Committee of the “Rovira i Virgili” University (Tarragona, Spain).

### Morris Water Maze

After 7 months of Al exposure (the animals being 5 months of age at the beginning of testing), spatial learning in a Morris water maze (MWM) was evaluated. The animals were 12 months old at the end of the behavioral testing. The water maze consisted of a circular tank (1 m in diameter; 60 cm high), divided into four quadrants. An escape platform (10 cm in diameter) was located 1 cm below the water surface in the target quadrant. Animals performed 4 trials per day for 5 consecutive days. During each trial, mice were allowed 60 sec to find the hidden platform and then remained on it for 30 sec. If the animal failed to find the platform in this time, it was then put on it by the experimenter. The inter-trial interval was 30 sec. The order of the three starting positions was randomized each day for each mouse. At the end of the fifth acquisition day, 4 h after the last training session, retention of the task was assessed by a probe

trial, which consisted of a 60 sec free swim without the escape platform. One week after the last training session, retention of the task was again tested by using the same procedure. Animal performance was recorded by a video camera placed above the maze and data were analyzed by the video tracking program Etho-Vision® (Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands). The time taken to find the escape platform, the distance traveled, and the swim velocity during the training sessions were measured. During the probe trials, the total time spent in the target quadrant, and the time spent in the other quadrants were measured to compare the time spent in the target quadrant to the average time spent in the other quadrants.

### Bromo-Deoxyuridine Administration and Sample Collection

In order to evaluate hippocampus cell proliferation, survival, and differentiation, two days after behavioral testing, 6 mice from each group were intraperitoneally injected with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, Steinheim, Germany) at 100 mg/kg/day over two consecutive days. One day and twenty-eight days after the last BrdU injection, the animals were anesthetized with tribromoethanol and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Brains were rapidly removed from the skulls, and divided coronally by free hand into two sections. One-third of each brain was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , while the remaining posterior two-thirds of each brain was post-fixed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in 4% paraformaldehyde. Next day, the brains were transferred to a 30% sucrose in PBS solution for 48 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , and then snap frozen in isopentane. Serial coronal sections, 40 micrometer thick, were cut with a cryostat and collected according to the fractionator principle [43]. Samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in a cryoprotection buffer (40% phosphate buffer 0.1M, 30% glycerol, and 30% ethylene glycol) for later immunohistochemical analysis.

### Immunohistochemistry

One out of six sections was taken for biotinylated-BrdU immunostaining. Free-floating coronal sections of brain were rinsed in Tris-buffered saline (TBS) and inactivated for endogenous phosphatase activity in 0.6%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -TBS. We then treated the sections for DNA denaturation by incubating them in 2M HCl at  $37^{\circ}\text{C}$  and rinsing them in 0.1M sodium borate buffer. Sections were blocked in TBS-Plus containing 3% normal goat serum and 1% Triton-X in TBS for 30 min. Antibody against BrdU (Serotec, Oxford, UK) was diluted 1:500 in blocking buffer and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Tissue sections were then washed with TBS-Plus and incubated for 2 h with a secondary antibody (biotinylated anti-rat IgG, 1:500, Vector Laboratories, Burlingame, USA). After additional washes, the secondary antibody was detected using the avidin-biotin complex reaction (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Diaminobenzidine (Vector Laboratories, Burlingame, USA) was used as a chromogen. Sections were thoroughly washed, mounted, and cover slipped.

Primary BrdU antibodies (Serotec, Oxford, UK), NeuN (Chemicon International, Temecula, USA) and GFAP antibodies (Sigma, Saint Louis, USA) were used for triple-

labeling immunofluorescence. After pre-treatment (see above) and a blocking step with TBS-plus containing 3% donkey serum, the sections were incubated in a mixture of antibodies against BrdU (1:500), NeuN (1:200), and GFAP (1:160) for 48 h at 4°C. After washing in TBS and TBS-plus, a cocktail of secondary antibodies (1:250) was applied for 4 h at room temperature in order to detect BrdU, NeuN, and GFAP (Alexa Fluor 488, 568 and 660; Fisher Bioblock Scientific, Madrid, Spain). Sections were again washed, mounted, and cover slipped.

### Quantification of BrdU Positive Cells

Data for proliferation were obtained by using methods of unbiased stereology. The total number of BrdU positive cells in the granular cell layer and hilus of the bilateral entire hippocampus were exhaustively counted in one out of six serial coronal sections of the brain. The set of selected sections represents one-sixth of the whole hippocampus and is representative of the total hippocampus. Positive cells were counted by means of optic microscopy (Olympus, CH20) through a 100× objective lens. Cells in the uppermost focal plane were discarded to avoid counting twice those cells that had been cut in two parts [44]. The total number of BrdU positive cells was estimated by multiplying the total number counted by 6.

To study survival and differentiation, fluorescence signals were observed by means of Nikon T2000E laser-scanning confocal microscopy. The total number of BrdU positive cells, as well as the total number of BrdU-NeuN and BrdU-GFAP cells in the dentate gyrus and the hilus of both right and left hippocampus, were exhaustively counted in one out of six serial coronal sections. The total number of BrdU, BrdU-NeuN and BrdU-GFAP was estimated by multiplying each value by 6. Data are presented as the percentage of BrdU-NeuN or BrdU-GFAP out of the total number of BrdU positive cells.

### Statistical Analysis

Behavioral data were analyzed by a two-way ANOVA (genotype x AI treatment). Repeated measures multivariate analysis of variance was also used when appropriate, with day or period of time as the within-subject factor. One-way ANOVA and a post-hoc Tukey or a DMS test were used to analyze differences between groups. Analysis for variance homogeneity using a Levene test was performed. Kruskal-Wallis test, and the Mann-Whitney U-test were also used when appropriate. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Spatial Learning in the Water Maze

#### Acquisition

A two-way ANOVA for repeated measures showed a general effect of the genotype on escape latency [ $F(1,35)=14.716, p = 0.001$ ] and distance traveled [ $F(1,35)=16.137, p = 0.000$ ], but no effect of the AI treatment was observed. However, an interaction genotype x treatment was detected on distance traveled in the water maze [ $F(1,35)=5.134, p = 0.030$ ].

A two-way ANOVA for repeated measures showed that the factor group had a significant effect on escape latency [ $F(1,35)=5.610, p = 0.003$ ], there being significant differences between groups on Days 1, 2, and 5 "Fig. (1)". A Post-hoc DMS test revealed that on Day 1, AI-exposed wild-type mice performed better than the other animals ( $p < 0.05$ ). On Day 2, significant differences were observed between wild-type mice exposed to AI and transgenic animals exposed and non-exposed to this element. There was a significant difference between control wild-type mice and transgenic mice exposed to AI ( $p < 0.05$ ). Differences were observed between wild-type mice groups and the AI-exposed transgenic group on Day 5 ( $p < 0.05$ ).

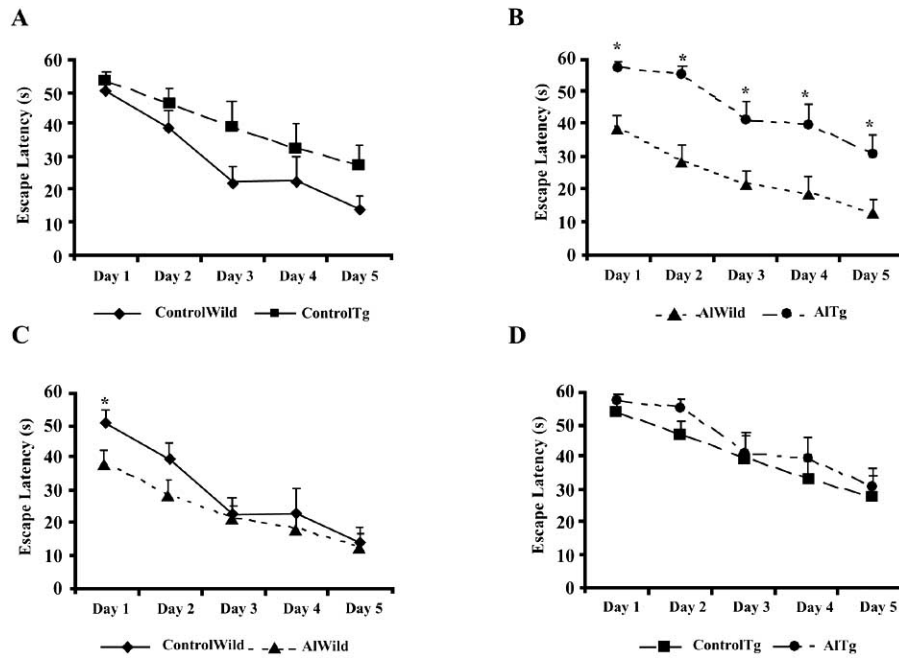
In order to better understand the genotype effect, a one-way ANOVA was performed showing significant differences between wild and transgenic mice exposed to AI over the 5 acquisition days, [ $F(1,18)=17.389, p = 0.001$ ].

A two-way ANOVA for repeated measures showed that factor group [ $F(1,35)=7.510, p = 0.001$ ] had a significant effect on the distance traveled during each acquisition day "Fig. (2)". Significant differences were observed on Days 1 and 2 between AI-exposed transgenic mice and the other groups ( $p < 0.05$ ). Moreover, on Day 2, AI-exposed wild-type mice showed different results than those corresponding to control transgenic mice ( $p < 0.05$ ). Significant differences between transgenic mice exposed to AI and wild-type mice were observed on Days 3 and 5 ( $p < 0.05$ ). Furthermore, a one-way ANOVA was also performed for distance traveled to better understand the genotype effect. Significant differences between wild-type and transgenic mice exposed to AI were found over the 5 acquisition days, [ $F(1,18)=24.794, p = 0.000$ ]. However, no significant differences were noted in swim speed.

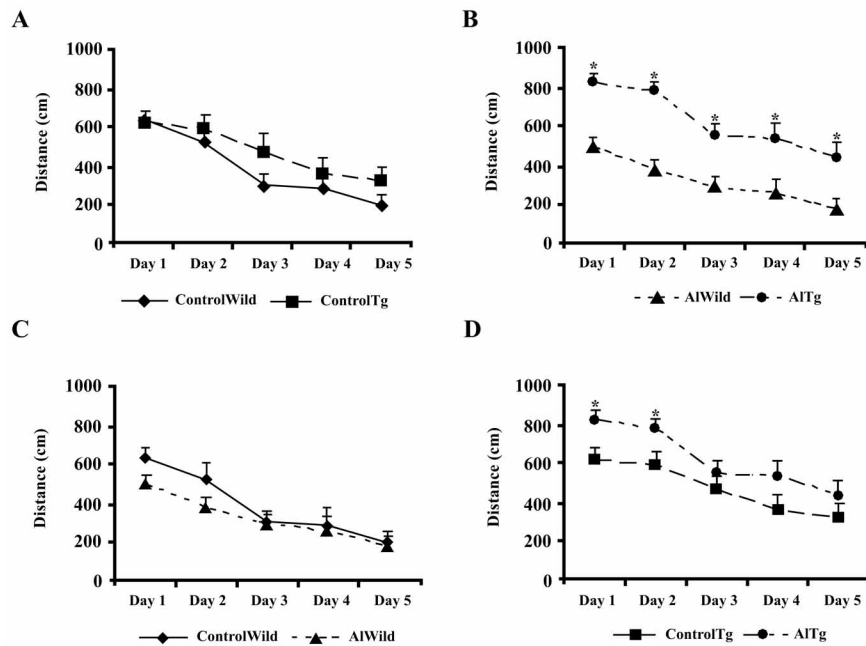
### Retention

In order to evaluate retention of the task, two probe trials without the platform were performed at 4 h and one week after the acquisition period, respectively. Four hours after acquisition, an overall effect of animal type in velocity was noted [ $F(1,35)=5.073, p = 0.031$ ]. A more detailed ANOVA analysis by genotype and treatment showed that transgenic animals swam faster than wild-type mice (data not shown). No other factor or interaction reached the level of statistical significance.

To better analyze performance of each group during the probe trial, a *t*-test was carried out which compared the time spent, in the target quadrant (Northwest, NW), with the mean time spent in the other 3 possible quadrants of the pool [(Time in NE + Time in SW + Time in SE)/3] "Fig. (3)". Significant differences were detected in the time spent in the target quadrant by the control wild ( $p = 0.031$ ) and the control transgenic ( $p = 0.043$ ) mice. Moreover, significant differences were observed in the distance traveled in the target quadrant by the control wild ( $p = 0.026$ ) and the control transgenic ( $p = 0.028$ ) animals (Fig. 3). The control transgenic mice also showed differences in velocity in the target quadrant ( $p = 0.039$ ) (data not shown). One week after acquisition, a second probe trial was performed, but no significant effects were found (data not shown).



**Fig. (1).** Escape latencies in the Morris water maze over 5 days of acquisition. (A) Aluminum non-treated groups, (B) Al-treated groups, (C) wild-type mice groups and (D) Tg2576 mice groups. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant differences between groups at  $p < 0.05$ .



**Fig. (2).** Distance traveled across 5 days of water maze acquisition. (A) Aluminum non-treated groups, (B) Al-treated groups, (C) wild mice groups and (D) Tg2576 mice groups. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant differences between groups at  $p < 0.05$ .

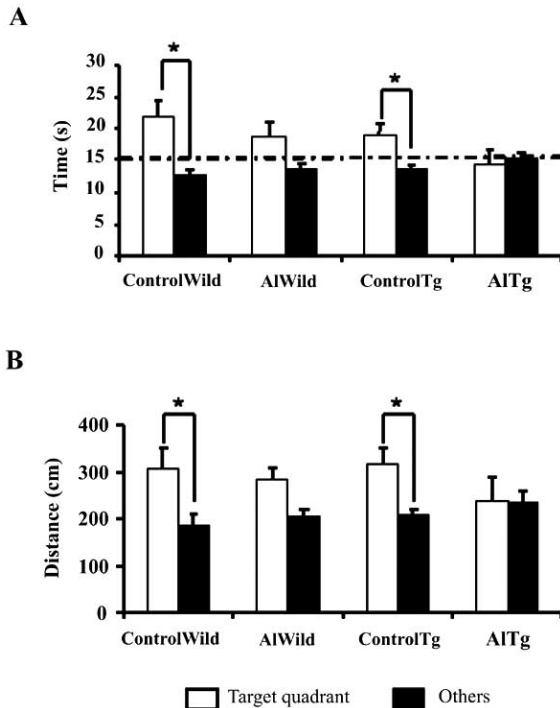
## Neurogenesis

### Proliferation

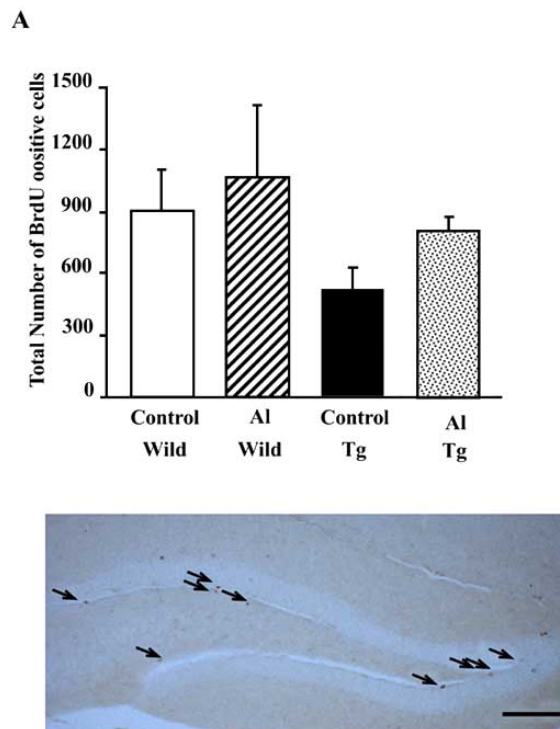
Neither Al exposure nor genotype had a statistically significant effect on cell proliferation in the hippocampus. Moreover, no significant differences were noted between groups “Fig. (4)”.

## Survival and Differentiation

Survival and differentiation of the new born cells were evaluated 28 days after the last BrdU injection (Table 1). Results did not show that genotype or treatment factors had any significant effect. No interactions were statistically significant. Moreover, no significant differences between groups were found “Fig. (5)”.



**Fig. (3).** Probe trial carried out 4 h after the last training session. Time (A) and distance traveled (B) in the target quadrant with respect to other quadrants. A discontinuous line indicates equal chance performance. Data are given as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Fig. (4).** Proliferation in the hippocampus 24 h after the last injection of 5-bromo-2-deoxyuridine. (A) Total number of BrdU positive cells in the hippocampus. Data are given as mean  $\pm$  S.E.M. (B) BrdU immunostaining positive cells in the dentate gyrus visualized using nickel-enhanced diaminobenzidine as chromogen. Arrows indicate positive cells. Scale bar: 50 $\mu$ m.

## DISCUSSION

Alzheimer's disease is one of the most prevalent causes of deterioration in modern society and particularly affects older people. However, little is known about the environmental factors influencing this serious disorder. Aluminum is a bioaccumulative element widely used in a number of commercial and industrial applications [45] and has been linked to some neuropathological characteristics in the brains of Alzheimer's patients [21, 23-26, 46]. This in turn has led a number of investigators in recent years to study the potential relationship between Al and AD [16, 47, 48].

In the present investigation, we have evaluated the effects of oral Al lactate at 0 and 11 mg/g of food on spatial learning and neurogenesis in Tg2576 and wild-type mice. The 11 mg/g Al dose was selected taking into account that the estimated mean dietary intake of Al is between 3 and 30 mg/day, and is up to 50-1000 mg/day in people consuming important amounts of Al-containing antacids [49].

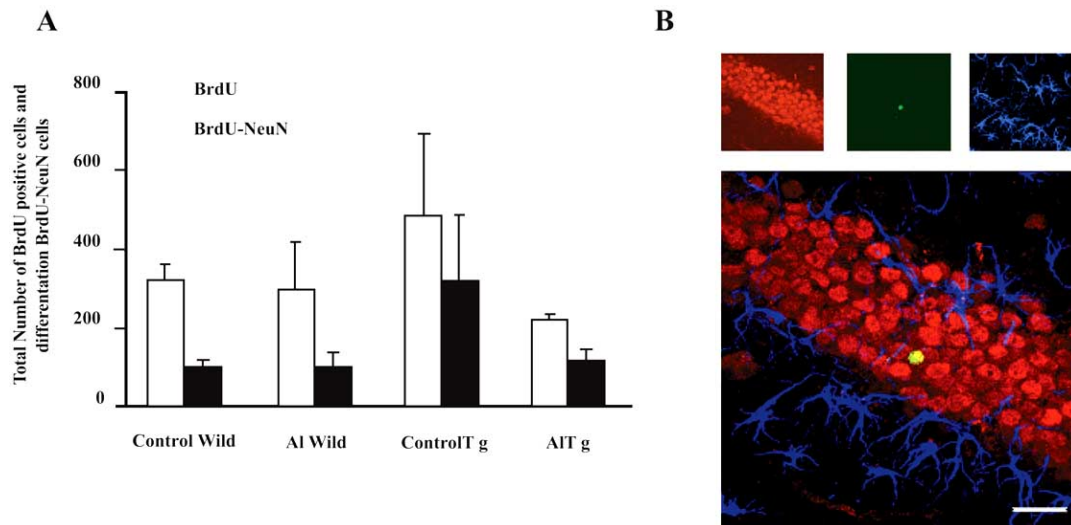
The current results reveal significant differences between the genotypes, indicating that Tg2576 mice had a slower learning curve and performed poorly on the water maze, which confirms previous data from our laboratory [42]. Although we were unable to observe a clear effect from the Al factor, the results show that Al had a deleterious effect on the acquisition of Tg2576 mice in the water maze. Longer latencies and distance traveled were detected, but no effect was detected on swimming velocity. Nevertheless, we noted that the interaction between genotype and treatment had an effect on the distance traveled in the water maze. Aluminum-treated Tg2576 mice showed an impaired acquisition compared to mice in the remaining groups. This effect was not evident in wild-type mice possibly due to the use of a classical version of the water maze.

Retention was clearly affected by Al in wild and Tg2576 mice 4 h after the acquisition phase. The results observed in Al-exposed Tg2576 mice confirm the deleterious effect of Al at 11 mg/g in this animal model of AD "Fig. (3)". However, when the animal's spatial long-term retention of the water maze was evaluated, all had a similar search time in all quadrants, which indicates that they did not remember the platform position.

The results of the present study agree with the results of previous studies which also show that Al has a deleterious effect on learning and memory [30, 50]. However, it must be noted that in the current investigation deleterious effects were only observed in Tg2576 mice, whereas wild-type mice exposed to Al tended to improve in the acquisition phase when compared to their respective controls. In this sense, the current results also agree with those of studies reporting an improvement after oral Al exposure in drinking water [51], or after lifelong consumption of Al in the diet [28]. The discrepancies may be due to differences in the doses, the way they are administered, the learning protocol used, or even different vulnerability to Al neurotoxicity. It is important to remark that the protocol of acquisition used in the present study was a classical version of the water maze [52]. A more sensitive protocol could have shown more clearly that Al affects performance in animals with differing vulnerabilities to AD. For instance, in our laboratory we have used a differ-

**Table 1. Total Number and Percentage of Cells Labeled with BrdU 28 Days After Last Injection, and Differentiation BrdU-NeuN and BrdU-GFAP**

Group	BrdU	BrdU-NeuN	BrdU-GFAP
Control Wild	322	102 (31.68%)	2 (0.62%)
Al Wild	302	104 (34.44%)	6 (1.99%)
Control Tg	482	316 (65.56%)	4 (0.83%)
Al Tg	222	114 (51.35%)	6 (2.70%)



**Fig. (5).** Survival and differentiation. **(A)** Estimated total number of BrdU positive cells 28 days after last injection of bromo-deoxyuridine, and co-localization BrdU-NeuN. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. **(B)** Representative triple-stained hippocampal section showing a cell labeled with bromodeoxyuridine (BrdU, green), neuron specific nuclear protein (NeuN, red), and glial fibrillary acidic protein (GFAP, blue). Confocal imaging shows co-localization of BrdU and NeuN. Scale bar indicates 20 $\mu$ m.

ent water maze protocol which increased the cognitive demand of the task and have detected differences in Tg2576 mice administered with a lower Al dose for a shorter period[42]. Comparing our previous results with the current data, it can be seen that a higher Al dose given over a longer period of time affected the performance of transgenic mice in the water maze. Because relatively simple versions of spatial, context conditioning, and configural/relational tasks are not particularly sensitive to hippocampal dysfunction, (as suggested by McDonald *et al.* [53]), a more challenging task may well detect more learning differences.

On the other hand, neurogenesis has been described as a mechanism of plasticity observed in some cerebral regions in animals. Neurogenesis can be affected by factors such as learning, age, stress, and environmental conditions [54]. This may well mean that Al has an effect on neurogenesis. In fact, neurogenesis has been suggested to be a marker of the evolution of AD [40]. Some recent data have shown increased neurogenesis in humans with AD [41], while an increase in several mice models of AD [50] has also been reported. However, the functional role of neurogenesis still remains an open question. Moreover, some authors have shown that adult-born granule neurons are necessary for the expression

of most hippocampal-demanding forms of spatial relational memory [55]. In the present study, because high variability within groups, no relevant results were observed regarding neurogenesis. Exposure to Al seems to have no effect on wild animals, whereas proliferation seems to be deteriorated in control Tg2576 mice. However, the total number of BrdU surviving cells was higher in control Tg2576 mice and had a higher percentage of differentiation to neuron than the other groups. This increase could be a compensatory mechanism in the progressive stage of neurodegeneration in these animals, as has been recently suggested [41, 56]. However, the beneficial effects of learning on the survival and differentiation of new-born cells should not be discarded.

In summary, the current results show that oral Al exposure has a deleterious effect on learning and memory in a mice model of AD, when evaluated using a classical version of the Morris water maze. On the other hand, neither Al exposure nor genotype at this time modified neurogenesis. Further studies should be carried out to assess discrepancies between mice age, Al exposure, and different protocols of spatial learning in order to better understand how the interactions between genetic and environmental factors can affect in AD.

## FINANCIAL DISCLOSURES

The authors report no conflicts of interest associated with the content of this paper.

Diana Ribes: no disclosures. M. Teresa Colomina: no disclosures. Paloma Vicens: no disclosures. José L. Domingo: no disclosures.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present research was supported by the "Fondo de Investigación Sanitaria FIS" through grant number PI 041673 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

## REFERENCES.

- [1] Srivareerat M, Tran TT, Alzoubi KH, Alkadhi KA. Chronic psychosocial stress exacerbates impairment of cognition and long-term potentiation in  $\beta$ -amyloid rat model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 65: 918-926 (2009).
- [2] Lee KW, Kim JB, Seo JS, Kim TK, Im JY, Baek IS, *et al.* Behavioral stress accelerates plaque pathogenesis in the brain of Tg2576 mice via generation of metabolic oxidative stress. *J Neurochem* 108: 165-175 (2009).
- [3] Liu SJ, Fang ZY, Yang Y, Deng HM, Wang JZ. Alzheimer-like phosphorylation of tau and neurofilament induced by cocaine *in vivo*. *Acta Pharmacol Sin* 24: 512-518 (2003).
- [4] Jones GR. Causes of Alzheimer's disease: paracetamol (acetaminophen) today? Amphetamines tomorrow? *Med Hypotheses* 56: 121-123 (2001).
- [5] Zawia NH, Basha MR. Environmental risk factors and the developmental basis for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 16: 325-337 (2005).
- [6] Altmann P, Cunningham J, Dhanesha U, Ballard M, Thompson J, Marsh F. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *BMJ* 319: 807-811 (1999).
- [7] Exley C, Esiri MM. Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall, UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 877-879 (2006).
- [8] Gauthier E, Fortier I, Courchesne F, Pepin P, Mortimer J, Gauvreau D. Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ Res* 84: 234-246 (2000).
- [9] McLachlan DR, Bergeron C, Smith JE, Boomer D, Rifat SL. Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. *Neurology* 46: 401-405 (1996).
- [10] Giorgianni C, Faranda M, Brecciaroli R, Beninato G, Saffiotti G, Muraca G, *et al.* Cognitive disorders among welders exposed to aluminum. *G Ital Med Lav Ergon* 25 (Suppl): 102-103 (2003).
- [11] Polizzi S, Pira E, Ferrara M, Bugiani M, Papaleo A, Albera R, *et al.* Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 23: 761-774 (2002).
- [12] Rifat SL, Eastwood MR, McLachlan DR, Corey PN. Effect of exposure of miners to aluminium powder. *Lancet* 336: 1162-1165 (1990).
- [13] Rondeau V, Jacqmin-Gadda H, Commenges D, Helmer C, Dartigues JF. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol* 169: 489-496 (2009).
- [14] Yokel RA, Florence RL. Aluminum bioavailability from the approved food additive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into a baked good, is lower than from water. *Toxicology* 227: 86-93 (2006).
- [15] Rogers MA, Simon DG. A preliminary study of dietary aluminium intake and risk of Alzheimer's disease. *Age Ageing* 28: 205-209 (1999).
- [16] Bharathi P, Vasudevaraju M, Govindaraju AP, Palanisamy K, Sambamurti, Rao KSJ. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J Med Res* 128: 545-556 (2008).
- [17] Savory J, Herman MM, Ghribi O. Mechanisms of aluminum-induced neurodegeneration in animals: Implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 10: 135-144 (2006).
- [18] Savory J, Huang Y, Herman MM, Reyes MR, Wills MR. Tau immunoreactivity associated with aluminum maltolate-induced neurofibrillary degeneration in rabbits. *Brain Res* 669: 325-329 (1995).
- [19] Wolf SA, Kronenberg G, Lehmann K, Blankenship A, Overall R, Staufenbiel M, *et al.* Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 60: 1314-1323 (2006).
- [20] Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, *et al.* Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25: 5217-5224 (2005).
- [21] Kawahara M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 8: 171-182, (2005); discussion 209-115.
- [22] Esparza JL, Gomez M, Romeo M, Mulero M, Sanchez DJ, Mallol J, *et al.* Aluminum-induced pro-oxidant effects in rats: protective role of exogenous melatonin. *J Pineal Res* 35: 32-39 (2003).
- [23] Pratico D, Uryu K, Sung S, Tang S, Trojanowski JQ, Lee VM. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *FASEB J* 16: 1138-1140 (2002).
- [24] Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Giorgetti B, Baliotti M. Increased mitochondrial and nuclear gene expression of cytochrome oxidase subunits I and IV in neuronal aging. *Ann NY Acad Sci* 1030: 303-309 (2004).
- [25] Rodella LF, Ricci F, Borsani E, Stacchiotti A, Foglio E, Favero G, *et al.* Aluminium exposure induces Alzheimer's disease-like histopathological alterations in mouse brain. *Histol Histopathol* 23: 433-439 (2008).
- [26] Szutowicz A. Aluminum, NO, and nerve growth factor neurotoxicity in cholinergic neurons. *J Neurosci Res* 66: 1009-1018 (2001).
- [27] Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt D, Cohen J, Harry J, *et al.* Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 10 (Suppl 1): 1-269 (2007).
- [28] Golub MS, Germann SL, Han B, Keen CL. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150: 107-117 (2000).
- [29] Roig JL, Fuentes S, Teresa Colomina M, Vicens P, Domingo JL. Aluminum, restraint stress and aging: behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure. *Toxicology* 218: 112-124 (2006).
- [30] Miu AC, Andreescu CE, Vasii 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 (2003).
- [31] Sethi P, Jyoti A, Singh R, Hussain E, Sharma D. Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology* 29: 1069-1079 (2008).
- [32] Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335 (1965).
- [33] Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17: 2492-2498 (1997).
- [34] Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260-265 (1999).
- [35] Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol* 8: 939-942 (1998).
- [36] Kempermann G, Gast D, Gage FH. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52: 135-143 (2002).
- [37] Shors TJ, Miesegae G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-376 (2001).
- [38] Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 501-508 (2009).

- [39] Shors TJ, Mathew J, Sisti HM, Edgecomb C, Beckoff S, Dalla C. Neurogenesis and helplessness are mediated by controllability in males but not in females. *Biol Psychiatry* 62: 487-495 (2007).
- [40] Chen Q, Nakajima A, Choi SH, Xiong X, Sisodia SS, Tang YP. Adult neurogenesis is functionally associated with AD-like neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 29: 316-326 (2008).
- [41] Gan L, Qiao S, Lan X, Chi L, Luo C, Lien L, *et al.* Neurogenic responses to amyloid-beta plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice. *Neurobiol Dis* 29: 71-80 (2008).
- [42] Ribes D, Colomina MT, Vicens P, Domingo JL. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 214: 293-300 (2008).
- [43] West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231: 482-497 (1991).
- [44] Encinas JM, Enikolopov G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol* 85: 243-272 (2008).
- [45] Yokel RA. The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology* 21: 813-828 (2000).
- [46] Drago D, Bolognin S, Zatta P. Role of metal ions in the abeta oligomerization in Alzheimer's disease and in other neurological disorders. *Curr Alzheimer Res* 5: 500-507 (2008).
- [47] Gomez M, Esparza JL, Cabre M, Garcia T, Domingo JL. Aluminum exposure through the diet: metal levels in A $\beta$ PP transgenic mice, a model for Alzheimer's disease. *Toxicology* 249: 214-219 (2008).
- [48] Exley C. Aluminium, tau and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12: 313-315, (2007); author reply 317-318.
- [49] Vasudevaraju P, Govindaraju M, Palanisamy AP, Sambamurti K, Rao KS. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J Med Res* 128: 545-556 (2008).
- [50] Jing Y, Wang Z, Song Y. Quantitative study of aluminum-induced changes in synaptic ultrastructure in rats. *Synapse* 52: 292-298 (2004).
- [51] Colomina MT, Roig JL, Torrente M, Vicens P, Domingo JL. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: Effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicol Teratol* 27: 565-574 (2005).
- [52] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60 (1984).
- [53] McDonald RJ, Devan BD, Hong NS. Multiple memory systems: the power of interactions. *Neurobiol Learn Mem* 82: 333-346 (2004).
- [54] Balu DT, Lucki I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 232-252 (2009).
- [55] Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, *et al.* Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE* 3: e1959 (2008).
- [56] Yu Y, He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, *et al.* Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus* 19(11): 1247-1253 (2009).

## Aluminum exposure reduces anxiety-like behavior in Tg2576 mice, but it does not affect $\beta$ -amyloid levels

Diana Ribes<sup>a,b</sup>, M. Teresa Colomina<sup>a,b</sup>, Paloma Vicens<sup>a,b,\*</sup>, José L. Domingo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Department of Psychology, Campus Sescelades, Universitat "Rovira i Virgili", 43007 Tarragona, Spain*

<sup>b</sup> *Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat "Rovira i Virgili", 43201 Reus, Spain*

-----  
\*Corresponding author. Tel.: +34 977 558176; fax: +34 977 558008.

E-mail address: paloma.vicens @urv.cat (P. Vicens).



## ABSTRACT

Since aluminum (Al) accumulation has been observed in neurofibrillary tangles and in senile plaques of patients suffering Alzheimer disease (AD), Al exposure has been suggested to be a potential factor contributing to the etiology of this serious neurodegenerative disease AD. In the present study, we evaluated the effects of Al lactate (11 mg/g of food) administered orally during 210 days to non-transgenic and transgenic Tg2576 mice, an species that overexpresses mutant amyloid precursor protein. The effects of Al were evaluated at 11 months of age through a functional observational battery (FOB), an open-field, and a light/dark box. Brain Al accumulation, the number of cerebral plaques, as well as the levels of  $\beta$ -amyloid 1-40 (A $\beta$ 40) and 1-42 (A $\beta$ 42) were also measured. Results showed Al-induced anxiolytic effects in the open-field and the light/dark test, while high levels of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 and amyloid plaques were observed in Tg2576 mice. However, Al did not change these parameters in Al-exposed Tg2576 mice. It can be concluded that dietary exposure to high doses of Al lactate during 210 days caused anxiolytic effects in mice independently on their genetic vulnerability to AD.

### *Keywords:*

Aluminum

Oral exposure

Tg2576 mice

Anxiety

$\beta$ -amyloid plaques

## 1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disease among older people. The major three pathological features of AD are extracellular deposition of A $\beta$  protein, formation of intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs), and selective neuronal loss (Bekris et al., 2010). Some AD cases (about 7%), particularly those at early onset, are familial and inherited as autosomal dominant disorders. They are usually linked to the presence of mutant genes that encode the amyloid precursor protein (APP) or the presenilins (PS1 or PS2). The etiology of sporadic AD is complex and multifactorial, with contributions from genetic and environmental factors.

In a considerable number of *in vivo* and *in vitro* studies, aluminum (Al) has shown to possess neurotoxic effects (Andersen et al., 2000; Golub et al., 2000; Aremu and Meshitsuka, 2005; Kaur et al., 2006). This element is the most abundant metal, and the third most abundant element after oxygen and silicon, in the earth's crust. Aluminum compounds are found in antacids, astringents, buffered aspirin, food additives, antiperspirants, municipal drinking waters, etc. In absence of occupational exposure and/or chronic use of certain Al-containing antacids and buffered aspirins, food is the main route of Al exposure, followed by drinking water. It has been estimated that the dietary intake of Al is between 3 and 30 mg/day (Vasudevaraju et al., 2008). When considering bioavailability, namely the fraction that is actually taken up into the blood stream, food is again the primary uptake source for non-occupationally exposed subjects (Krewski et al., 2007).

Effects on behavioral and cognitive function following Al exposure has been reported in humans and rodents (Polizzi et al., 2002; Ribes et al., 2008; Walton, 2009). It has been also suggested that Al may be involved in neurodegenerative disorders such as dialysis encephalopathy and Parkinson dementia of Guam (Piccardo et al., 1988; Garruto, 1991). However, evidence for the contribution of Al to AD remains highly controversial. Some epidemiological investigations have suggested a link between Al levels in drinking water and AD (Rondeau et al., 2000, 2009), while human and rodent studies have showed learning and memory deficits after Al exposure (van Rensburg et al., 2001; Rebai and Djebli, 2008; Sethi et al., 2008). Aluminum accumulation in the nuclei of nerve cells and in neurofibrillary tangles (using various techniques) has been also noted in the AD brain (Yumoto et al., 1996; Murayama et al., 1999; Walton, 2006).

Moreover, recent studies have also shown that Al accumulates in senile plaques in AD brains (Collingwood et al., 2008; Yumoto et al., 2009).

Genetic investigations strongly suggest that A $\beta$  peptides have a central role in AD pathogenesis. Because of their profuse extracellular deposition in senile and diffuse plaques and vascular walls, they are considered an important pathologic marker of AD (Bekris et al., 2010). In addition, A $\beta$  is present in neurons and glial cells, as well as in soluble oligomeric forms that diffuse along the narrow extracellular space of the brain (Roher et al., 2009). The amyloid cascade hypothesis suggests that the imbalance of the A $\beta$  peptide triggers neuritic plaques deposition, being the major cause for neuronal death and dysfunction. The formation of these plaques results in microglial and astrocytic activation, oxidative damage, and tau aggregation, culminating in neuronal loss and dysfunction, and leading to dementia (Robinson and Bishop, 2002; Verdile et al., 2004).

In recent years, transgenic mice models of AD in which human APP (huAPP) is expressed, have shown to be a useful tool for studying A $\beta$  pathogenesis. The Tg2576 mouse was developed by Hsiao and co-workers (1996) as an animal model of AD. These transgenic animals bear the “Swedish” familial AD mutation, consisting of a double amino acid substitution in amyloid precursor protein (APP<sub>K670N, M671L</sub>), resulting in overproduction of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 levels in the hippocampus, amygdale and cortex, with increasing age that coincides with the appearance of spatial learning deficits in a reference memory water maze task (Kawarabayashi et al., 2001; Westerman et al., 2002). In a recent study in which Tg2576 and wild type mice were used, we demonstrated that oral exposure to 1 mg/g of Al lactate during 100 days, impaired performance in water maze task in wild and transgenic mice, which had been initially exposed at nine months of age without altering A $\beta$  levels in Al-treated transgenic mice (Ribes et al., 2008).

In the present study, we assessed the effects of oral Al lactate exposure (11 mg/g Al of food) during 180 days on motor activity and anxiety-like behavior in an open-field and a light/dark box test. Modifications in A $\beta$ 40 and A $\beta$ 1-42 levels and in the number of A $\beta$  plaques were also evaluated.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals and treatment*

After authorization from Taconic Europe (Ejby, Denmark), the Tg2576 colony was maintained by crossing Tg2576 male mice with C57BL6/SJL female mice. At 2 months of age, offspring were DNA genotyped by PCR Polymerase Chain Reaction (PCR) from tail biopsies. Twenty transgenic male (Tg 2576) and 20 wild control mice were then separated and individually housed in plastic cages. All mice were maintained in an animal room on a 12-h light/dark automatic light cycle (light: 0800–2000 h), at a temperature of  $22 \pm 2$  °C, and a relative humidity of  $50 \pm 10\%$ . All animals were allowed free access to food and water and given a standard chow diet (Harlan, Barcelona, Spain) until 5 months of age. At this time, one-half of the animals were given Al lactate at 0 or 1.11 mg of Al/g of diet for 210 days. Animals were divided into four experimental groups: Al Wild (n = 10), Control Wild (n = 10), Al Tg (n = 10), and Control Tg (n = 10). Aluminum concentrations were measured in the standard chow (27.1 µg/g), supplemented chow (1107.5 µg/g), and tap water (14.0 µg/g). Body weight, food and water consumption were measured once a month throughout the treatment period. The experimental procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the “Rovira i Virgili” University (Tarragona, Spain).

## *2.2. Functional observational battery*

At 11 months old (after 6 months of oral Al exposure), a functional observational battery (FOB) was performed. FOB is a neurotoxicity screening assay that allows qualitative and quantitative evaluations of acute behavioral and physiological effects of toxic substances. In the current study, the FOB protocol consisted of eighteen endpoints, which evaluated central nervous system (CNS) activity and excitability, neuromuscular and autonomic effects, and sensorimotor reactivity (Table 1) (Sills et al., 2000). Animals were observed at their home cages (1 min), in the observer's hand (30 sec), and in an exploratory white box (60 cm x 90 cm), where the observer analyzed the sensorimotor reactivity (approach response, click response, touch response).

## *2.3. Open-field*

The purpose of the open-field is to examine animal responses to novel environment (motor activity and anxiety-like behavior) (Archer, 1973). The apparatus consisted of a wood  $1 \times 1$  m square surrounded by a 47 cm-high dark colored wall. Two

areas were differentiated in the open-field, the periphery (10 cm from the wall) and the central area (comprising the rest of the open-field). At the beginning of the test, mice were placed in the centre of the arena, being allowed to explore the environment for 20 min. The path and movements of the animals were recorded by a video camera (Sony CCD-IRIS model), which was placed above the square. At the end of each trial, the arena was cleaned with 50% ethanol. The video tracking program Etho-Vision<sup>®</sup> (Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands) was used to quantify the activity. Total distance traveled, time spent in each area, and the number of rearings (as a measure of vertical activity) were recorded. The center distance was divided by the total distance in order to obtain the center distance-to-total distance ratio, which is used as an index of anxiety-related responses (Wang et al., 2002).

#### *2.4. Light/dark box test*

The light/dark box test is based on the innate aversion of rodents to brightly illuminated areas and on spontaneous exploratory behavior of rodents in response to mild stressors; that is to say, novel environment and light (Crawley and Goodwin, 1980). Therefore, this test might be useful to predict the anxiety-like activity of Al exposure in mice. The apparatus consisted of a box divided into two compartments (50 x 25 x 27 cm) by a small doorway (5 × 5 cm) through which animals could freely moved. One of these compartments was white painted and lit by a halogen lamp, while the second one was black painted. Mice were initially confined at the dark compartment. The latency of first entry to the white compartment, the time spent in the light and dark areas, as well as the number of transitions between areas were measured for 5-min test periods.

#### *2.5. A $\beta$ plaque quantification*

After completion of behavioral testing (a total exposure of 210 days), animals were deeply anesthetized with tribromoethanol and sacrificed by decapitation. Brains were rapidly removed from the skulls and coronally divided by free hand in two sections. Two-third posterior brain was post-fixed for four days at 4°C in 4% paraformaldehyde. On the fifth day, brains were transferred to a 30% sucrose/phosphate buffered solution (PBS) for 48 hr at 4°C, and then snap frozen in isopentane. Serial coronal sections, 40  $\mu$ m thick, were cut with a cryostat and stored at -20°C in a

cryoprotection buffer (40% phosphate buffer 0.1M, 30% glycerol, and 30% ethylene glycol) for later immunohistochemical analyses.

One out of six sections was taken for double immunofluorescence. Free-floating coronal sections were rinsed in TBS and inactivated for endogen phosphatase activity in 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TBS. Sections were blocked in TBS-Plus containing 3% normal goat serum and 1% Triton-X in TBS for 30 min. Antibodies monoclonal anti- $\beta$ -amyloid (1:500, Sigma, Saint Louis, MO, USA) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:250 Sigma, Saint Louis, MO, USA) with blocking buffer, were incubated during 48 h at 4°C. Afterward, a cocktail of secondary antibodies (1:250) was applied for 4 hr at room temperature to detect A $\beta$  plaques and GFAP (Alexa Fluor 568 and 660; Fisher Bioblock Scientific, Madrid, Spain). Finally, sections were washed, mounted, and cover slipped, and the total number of A $\beta$  deposits were counted in cortex and hippocampus of each animal using a Nikon T2000E laser-scanning confocal microscopy. Three animals per group, with a total of 10 coronal sections from each one, were used for A $\beta$  plaque quantification.

## 2.6. *$\beta$ -amyloid determination*

Cortex and hippocampus (n = 4 per group) were homogenized in 0.8 ml of 5M guanidine HCl and 50 mM tris buffer, being centrifuged at 100,000  $\times$  g for 1 h at 4°C. The A $\beta$  peptides in the supernatant were analyzed using a sandwich ELISA system for either A $\beta$ 40 or A $\beta$ 42 commercially obtained from Biosource (Barcelona, Spain) according to the manufacturer's protocol. Total protein levels were also determined by a Quick start Bradford protein assay kit (Bio Rad, Barcelona, Spain). The A $\beta$  levels were expressed as ng/mg of protein. Each zone (cortex, hippocampus) was analyzed in duplicated or triplicated, with the average value reported for each brain.

## 2.7. *Aluminum analysis*

To analyze Al cerebral levels, the whole brain (excepting cerebellum, hippocampus, brainstem and cortex) was weighed in a microsampling quartz insert, and 65% nitric acid (Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) was added to digest the samples. The microsampling inserts were then introduced in Teflon vessels. The vessels

were put into a microwave oven Star D (Milestone, Sorisole, Italy) during 30 min at 185 °C and 1000 W according to the manufacturer's instructions. The digested was subsequently diluted at 5 ml with milli-Q water. All materials were previously washed with 10% nitric acid in order to avoid possible sample contamination. For quality control, brain (prepared in-house) and NIST Standard Reference Material (Bovine liver 1577b, NIST, Gaithersburg, MD, USA) were measured in each assay. Aluminum concentrations were determined by means of a computer-controlled sequential inductively coupled plasma spectrometer (PerkinElmer Elan 600) according to DIN EN ISO 17294-2 (Gomez et al., 2008). Detection limit (LOD) was 1.00 µg/kg.

### 2.8. Statistical analysis

Data were analyzed by two-way (Al × genotype) analyses of variance (ANOVA). Repeated measures multivariate analysis of variance, using the day as the within-subject factor, were also used when appropriate. One-way ANOVA and post-hoc Tukey test were used to analyze differences between groups. Levene's test was used to determine variance homogeneity. Non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-test) were used when heterogeneity of variance was detected. In all cases, statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Functional Observational Battery (FOB)

Two-way ANOVA test showed an overall effect of genotype [ $F(1,39) = 7.309$ ,  $P = 0.010$ ] on arousal. However, other factors or interactions did not reach the level of statistical significance. Significant differences between groups were observed [ $X^2 = 10.796$ ,  $P = 0.013$ ] indicating an increased arousal in non-treated transgenic animals compared to Al-treated and non-treated wild mice.

With regard to eating/drinking frequency, a two-way ANOVA indicated an interaction between Al and genotype [ $F(1,39) = 6.818$ ,  $P = 0.013$ ], but neither other factors nor interactions reached the level of statistical significance. Significant differences between groups [ $X^2 = 9.583$ ,  $P = 0.022$ ] were also noted. Mann-Whitney *U*-test showed high activity levels in the Tg2576 control group with respect to the wild control and Al-treated transgenic animals.

An overall effect of Al [F(1,39)= 4.891, P = 0.033] on hand reaction was detected. Notwithstanding, no effects of genotype or Al × genotype interaction were observed. Moreover, no significant differences between groups were noted. Finally, two-way ANOVA also showed an overall effect of genotype on palpebral closure [F(1,39)= 4.800, P = 0.035]. No effects of Al or Al × genotype interactions were observed, while differences between groups did not reach the level of statistical significance.

### 3.2. *Open-field*

Total distance traveled (horizontal activity), number of rearings (vertical activity), and velocity in the open-field were evaluated by two-way ANOVA (Al × genotype). No overall effects or interactions were detected. A more detailed evaluation of the activity in the center of the apparatus showed an overall effect of treatment on time [F(1,39)=6.056, P =0.019], number of rearings [F(1,39)=4.357, P =0.044], as well as in the ratio distance moved in the center with respect to the total distance moved [F(1,39)=7.057, P =0.012]. Aluminum-treated groups spent more time, performed more rearings, and traveled greater distances in the center than Al non-treated groups did. An overall effect of genotype was also shown in velocity (cm/s) [F(1,39)=5.765, P =0.022], indicating that transgenic mice were faster than wild animals. No interaction between Al × genotype resulted significant. One-way ANOVA showed significant differences between groups [F(3,39)=3.345, P = 0.030] in the time spent in the center of the apparatus. Post-hoc Tukey test indicated that Al-treated wild mice spent more time in the center of the open-field than the transgenic group non-exposed to Al.

To evaluate habituation effects, the 20 min period was divided in fractions of 5 min. A two-way ANOVA (Al × genotype) for repeated measures was performed. Habituation to the open-field was observed in both, horizontal [F(3,34)= 32.552, P < 0.001] and vertical [F(3,34)= 4.143, P = 0.013] activities. An overall effect of the group [F(3,36)= 2.981, P = 0.044] was noted in the velocity in the center, indicating a higher velocity during the period 10-15 min in Al-treated transgenic mice compared to wild and Tg2756 control mice.

### 3.3. *Light/dark box test*



Results of this test showed an overall effect of Al in the time spent in the dark compartment [ $F(1,39)= 4.838$ ,  $P = 0.034$ ] and in the number of transitions between areas [ $F(1,39)= 5.351$ ,  $P = 0.027$ ]. An overall effect of genotype was also observed in latency to light compartment [ $F(1,39)= 10.460$ ,  $P = 0.003$ ] and the time spent in the dark compartment [ $F(1,39)= 5.323$ ,  $P = 0.027$ ]. Interactions did not reach the level of statistical significance.

One-way ANOVA showed differences between groups in transitions number [ $F(3,39)= 3.088$ ,  $P = 0.039$ ]. Post-hoc Tukey test showed a significant increase of transitions in Al-treated wild mice compared to non-exposed Tg2576 mice. Significant differences between groups were also detected using the non-parametric Kruskal-Wallis test in latency to the light compartment [ $X^2= 8.606$ ,  $P = 0.035$ ] and in the time spent in the dark compartment [ $X^2= 7.949$ ,  $P = 0.047$ ]. Further analysis revealed a shorter latency to light compartment in Al-treated and control wild mice, compared with the transgenic control group. The Al-exposed wild mice spent less time in the dark compartment than wild and transgenic control groups did it.

### *3.4. A $\beta$ plaque quantification*

An overall effect of genotype in the total number of plaques in cortex [ $F(1,12)= 14.319$ ,  $P = 0.009$ ] were detected by two-way ANOVA (Al x genotype). However, no effects of Al x genotype were observed. Significant differences between groups in the total number of plaques in cortex [ $F(3,11)= 4.846$ ,  $p= 0.048$ ] were noted by a one-way ANOVA. Post-hoc Tukey test indicated a greater number of plaques in transgenic mice compared to wild animals.

### *3.5. A $\beta$ determination and aluminum analysis*

A two-way ANOVA (Al  $\times$  genotype) analysis showed an overall effect of genotype in A $\beta$ 40 in cortex [ $F(1,15)= 10.976$ ,  $P = 0.006$ ] and hippocampus [ $F(1,15)= 7.282$ ,  $P = 0.019$ ], as well as in A $\beta$ 42 in cortex [ $F(1,15)= 5.315$ ,  $P = 0.040$ ] and hippocampus [ $F(1,15)= 14.003$ ,  $P = 0.003$ ]. However, no effects of Al, or Al  $\times$  genotype interaction, were observed. Significant differences between groups in A $\beta$ 40 [ $X^2= 11.471$ ,  $p= 0.009$ ] and in A $\beta$ 42 [ $X^2= 8.096$ ,  $p= 0.044$ ] in hippocampus were detected. A $\beta$ 40 levels in the hippocampus were higher in transgenic animals than in wild mice.

Similar differences were detected in A $\beta$ 42 between Al-treated wild and transgenic mice. On the other hand, no significant differences between groups were detected in Al accumulation in brain.

#### 4. Discussion

The present study was aimed to evaluate the effects of high oral doses of Al lactate, given to wild and Tg2576 mice for 210 days, on motor activity and anxiety-like behavior, as well as the effects on A $\beta$  peptide levels and Al accumulation in brain. The used mice have different genetic susceptibility to develop AD. The current results demonstrated a higher arousal and greater activity in control transgenic animals, which was evidenced by eating/drinking frequency. These results agree with previously reported data, which showed an increase of locomotor activity in Tg2576 mice using the open-field test (Gil-Bea et al., 2007). In the present investigation, palpebral closure was observed in Tg2576 animals, corroborating that this is a measure of autonomic instability, as well as a sign of distress (Hermes et al., 2008). Since AD has been associated with a wide variety of dysautonomic phenomena, it could be an important marker in preclinical stages of AD (Royall, 2008).

In this investigation, we also observed that 11 mg/g of oral Al lactate given during 180 days increased the time spent in the center of the open-field, the vertical activity, as well as the ratio of distance traveled in the center. It indicates anxiolytic effects of chronic oral Al lactate administration at high doses, similarly to what happens with Al chloride given orally to rats. Recently, it has been demonstrated that Al chloride increased the number of entries and the time spent in the open arm in an elevated plus maze after two months of exposure (Bhalla et al., 2010). A previous study also indicated an increase of motor activity and head-dipping in mice treated with Al chloride (Rebai and Djebli, 2008).

Anxiolytic effects of Al observed in the open-field were also detected in the light/dark box test. Both Al-exposed groups, especially wild mice, spent less time in the dark compartment, crossing more times. Similarly, orally exposed rats to Al chloride from gestation until 4 months of age, showed a decrease of time spent in the dark box (Erazi et al., 2010). It suggests that this effect may be due to the influence of Al on GABAergic neurotransmission, as some studies indicated that Al chloride administered intraperitoneally to rats increased GABA levels in the thalamic area and in the

neocortex (Nayak and Chatterjee, 2001; Shuchang et al., 2008). It is important to remark that untreated Tg2576 mice showed a longer latency to the light compartment, while they spent a longer time in the dark compartment. However, when using the elevated plus-maze, Tg2576 mice showed lower anxiety levels than their littermates (Lalonde et al., 2003; Ognibene et al., 2005). Differences between tests could reflect different emotional aspects (Ramos et al., 2008).

Since an age-related accumulation of both senile and diffuse A $\beta$  plaques in neocortex and hippocampus from 12-13 months of age have been described (Apelt and Schliebs 2001; Callahan et al. 2001; Braakman et al. 2006), as expected, higher A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 levels, and greater number of plaques, were found in transgenic mice. Senile plaques were recorded more clearly in the cerebral cortex, while higher levels of the A $\beta$  isoform 1-40 were found. These results agree with those of a previous study also with Tg2576 mice, in which especially increased A $\beta$ 40 levels, as well as greater number of plaques in the cortex after 12 months of age, were observed (Pratico et al., 2001).

On the other hand, the current results showed a slight decrease of A $\beta$ 42 in Al-exposed transgenic mice. However, the differences did not reach the level of statistical significance. This was also observed in our previous study (Ribes et al., 2008), where dosage and time of Al exposure were lower. In relation to this, the results of studies conducted both *in vivo* and *in vitro* show differences. Thus, some studies indicated that Al exposure increased and caused aggregation of A $\beta$ . In this sense, the primary cultured neurons of rat exposed to Al chloride for more than three weeks, and Tg2576 mice receiving a diet supplemented with Al during 9 months, produced accumulation of  $\beta$ -amyloid protein, increases in A $\beta$  levels, and accelerated plaque deposition, respectively (Kawahara et al., 2001; Pratico et al., 2002). However, higher concentrations of Al sulfate failed to evidence any significant effect on A $\beta$  levels in murine neuroblastoma and rat glioma cell cultures. Moreover, exposure to drinking water supplemented with Al lactate for ten weeks in young mice, did not significantly alter the A $\beta$ 40 levels (Campbell et al., 2000, 2004). Consequently, further studies are clearly needed in order to investigate the relationship between Al exposure and A $\beta$  aggregation.

With regard to cerebral Al accumulation, the present results did not show differences between groups, similarly to previous studies carried out in rats (Gomez et al., 1997; Golub et al., 2000; Colomina et al., 2002). In a recent investigation performed in our laboratory (data not published), we observed an increased brain Al accumulation in all experimental groups. In the current study, a lower Al dose (1 mg/g) given during a

more reduced time (100 days) was used. Our results suggest that Al accumulation depends on the animal age rather than the Al dose. With respect to it, there is some data suggesting that Al accumulates in human brains with age (Golub et al., 2000). It should be also taken into account that some studies demonstrated that the administration route and the chemical Al form could result in diverging Al accumulation in tissues including cerebral regions (Dlugaszek et al., 2000; Sanchez-Iglesias et al., 2007).

In conclusion, dietary exposure to high oral doses of Al lactate during 210 days caused anxiolytic effects in mice independently on the genetic vulnerability to AD. Moreover, oral Al exposure would affect neither the levels of beta-amyloid 1-40 and 1-42, nor the number of plaques. It suggests that Al brain accumulation is dependent on the age rather than the Al doses.

### **Conflict of interest**

None.

### **Acknowledgement**

The present research was financially supported by the “Fondo de Investigación Sanitaria FIS” through grant number PI 041673 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

### **References**

- Andersen, H. R., Nielsen, J. B., Grandjean, P., 2000. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology* 144, 121-127.
- Apelt, J., Schliebs, R., 2001. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res.* 894, 21-30.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.* 21, 205-235.
- Aremu, D. A., Meshitsuka, S., 2005. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Res.* 1031, 284-296.
- Bekris, L. M., Yu, C. E., Bird, T. D., Tsuang, D. W., 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23, 213-227.

- Bhalla, P., Garg, M. L., Dhawan, D. K., 2010. Protective role of lithium during aluminium-induced neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 56, 256-262.
- Braakman, N., Matysik, J., van Duinen, S. G., Verbeek, F., Schliebs, R., de Groot, H. J., Alia, A., 2006. Longitudinal assessment of Alzheimer's beta-amyloid plaque development in transgenic mice monitored by in vivo magnetic resonance microimaging. *J. Magn. Reson. Imaging* 24, 530-536.
- Callahan, M. J., Lipinski, W. J., Bian, F., Durham, R. A., Pack, A., Walker, L. C., 2001. Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 158, 1173-1177.
- Campbell, A., Becaria, A., Lahiri, D. K., Sharman, K., Bondy, S. C., 2004. Chronic exposure to aluminum in drinking water increases inflammatory parameters selectively in the brain. *J. Neurosci. Res.* 75, 565-572.
- Campbell, A., Kumar, A., La Rosa, F. G., Prasad, K. N., Bondy, S. C., 2000. Aluminum increases levels of beta-amyloid and ubiquitin in neuroblastoma but not in glioma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223, 397-402.
- Colomina, M. T., Roig, J. L., Sanchez, D. J., Domingo, J. L., 2002. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology* 23, 775-781.
- Collingwood, J. F., Chong, R. K., Kasama, T., Cervera-Gontard, L., Dunin-Borkowski, R. E., Perry, G., Posfai, M., Siedlak, S. L., Simpson, E. T., Smith, M. A., Dobson, J., 2008. Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J. Alzheimers Dis.* 14, 235-245.
- Crawley, J., Goodwin, F. K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 167-170.
- Długaszek, M., Fiejka, M. A., Graczyk, A., Aleksandrowicz, J. C., Slowikowska, M., 2000. Effects of various aluminium compounds given orally to mice on Al tissue distribution and tissue concentrations of essential elements. *Pharmacol. Toxicol.* 86, 135-139.
- Erazi, H., Sansar, W., Ahboucha, S., Gamrani, H., 2010. Aluminum affects glial system and behavior of rats. *C. R. Biol.* 333, 23-27.
- Garruto, R. M., 1991. Pacific paradigms of environmentally-induced neurological disorders: clinical, epidemiological and molecular perspectives. *Neurotoxicology* 12, 347-377.
- Gil-Bea, F. J., Aisa, B., Schliebs, R., Ramirez, M. J., 2007. Increase of locomotor activity underlying the behavioral disinhibition in tg2576 mice. *Behav. Neurosci.* 121, 340-344.
- Golub, M. S., Germann, S. L., Han, B., Keen, C. L., 2000. Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice. *Toxicology* 150, 107-117.
- Gomez, M., Esparza, J. L., Cabre, M., Garcia, 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.
- Gomez, M., Sanchez, D. J., Llobet, J. M., Corbella, J., Domingo, J. L., 1997. The effect of age on aluminum retention in rats. *Toxicology* 116, 1-8.
- Hermes, G., Ajioka, J. W., Kelly, K. A., Mui, E., Roberts, F., Kasza, K., Mayr, T., Kirisits, M. J., Wollmann, R., Ferguson, D. J., Roberts, C. W., Hwang, J. H., Trendler, T., Kennan, R. P., Suzuki, Y., Reardon, C., Hickey, W. F., Chen, L., McLeod, R., 2008. Neurological and behavioral abnormalities, ventricular dilatation, altered cellular functions, inflammation, and neuronal injury in brains

- of mice due to common, persistent, parasitic infection. *J. Neuroinflammation* 5, 48.
- 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.
- Kaur, A., Joshi, K., Minz, R. W., Gill, K. D., 2006. Neurofilament phosphorylation and disruption: a possible mechanism of chronic aluminium toxicity in Wistar rats. *Toxicology* 219, 1-10.
- 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, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe, K. H., Younkin, S. G., 2001. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, 372-381.
- Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A. M., 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.
- Lalonde, R., Lewis, T. L., Strazielle, C., Kim, H., Fukuchi, K., 2003. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res.* 977, 38-45.
- Murayama, H., Shin, R. W., Higuchi, J., Shibuya, S., Muramoto, T., Kitamoto, T., 1999. Interaction of aluminum with PHFtau in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method. *Am J Pathol* 155, 877-885.
- Nayak, P., Chatterjee, A. K., 2001. Effects of aluminium exposure on brain glutamate and GABA systems: an experimental study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 39, 1285-1289.
- Ognibene, E., Middei, S., Daniele, S., Adriani, W., Ghirardi, O., Caprioli, A., Laviola, G., 2005. Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 156, 225-232.
- Piccardo, P., Yanagihara, R., Garruto, R. M., Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., 1988. Histochemical and X-ray microanalytical localization of aluminum in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Acta Neuropathol.* 77, 1-4.
- Polizzi, S., Pira, E., Ferrara, M., Bugiani, M., Papaleo, A., Albera, R., Palmi, S., 2002. Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 23, 761-774.
- Pratico, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanoswki, J. Q., Lee, V. M., 2001. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J. Neurosci.* 21, 4183-4187.
- Pratico, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *Faseb J.* 16, 1138-1140.
- Ramos, A., Pereira, E., Martins, G. C., Wehrmeister, T. D., Izidio, G. S., 2008. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behav. Brain. Res.* 193, 277-288.

- Rebai, O., Djebli, N. E., 2008. Chronic Exposure to Aluminum Chloride in Mice: Exploratory Behaviors and Spatial Learning. *Adv. Biol. Res* 2, 26-33.
- 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.
- Robinson, S. R., Bishop, G. M., 2002. Abeta as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 23, 1051-1072.
- Roher, A. E., Esh, C. L., Kokjohn, T. A., Castano, E. M., Van Vickle, G. D., Kalback, W. M., Patton, R. L., Luehrs, D. C., Dausgs, I. D., Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Soares, H., Quinn, J. F., Kaye, J., Connor, D. J., Silverberg, N. B., Adler, C. H., Seward, J. D., Beach, T. G., Sabbagh, M. N., 2009. Amyloid beta peptides in human plasma and tissues and their significance for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 5, 18-29.
- Rondeau, V., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H., Dartigues, J. F., 2000. Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study. *Am. J. Epidemiol.* 152, 59-66.
- Rondeau, V., Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Helmer, C. and Dartigues, J. F. 2009. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol* 169, 489-496.
- Royall, D. R., 2008. Insular Alzheimer disease pathology and the psychometric correlates of mortality. *Cleve. Clin. J. Med.* 75 Suppl 2, S97-99.
- Sanchez-Iglesias, S., Soto-Otero, R., Iglesias-Gonzalez, J., Barciela-Alonso, M. C., Bermejo-Barrera, P., Mendez-Alvarez, E., 2007. Analysis of brain regional distribution of aluminium in rats via oral and intraperitoneal administration. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 21 Suppl 1, 31-34.
- Sethi, P., Jyoti, A., Singh, R., Hussain, E., Sharma, D., 2008. Aluminium-induced electrophysiological, biochemical and cognitive modifications in the hippocampus of aging rats. *Neurotoxicology* 29, 1069-1079.
- Shuchang, H., Qiao, N., Piye, N., Mingwei, H., Xiaoshu, S., Feng, S., Sheng, W., Opler, M., 2008. Protective effects of *gastrodia elata* on aluminium-chloride-induced learning impairments and alterations of amino acid neurotransmitter release in adult rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* 26, 467-473.
- Sills, R. C., Valentine, W. M., Moser, V., Graham, D. G. and Morgan, D. L. 2000. Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects. *Toxicol Pathol* 28, 142-148.
- van Rensburg, S. J., Potocnik, F. C., Kiss, T., Hugo, F., van Zijl, P., Mansvelt, E., Carstens, M. E., Theodorou, P., Hurly, P. R., Emsley, R. A., Taljaard, J. J., 2001. Serum concentrations of some metals and steroids in patients with chronic fatigue syndrome with reference to neurological and cognitive abnormalities. *Brain Res, Bull*, 55, 319-325.
- Vasudevaraju, P., Govindaraju, M., Palanisamy, A. P., Sambamurti, K., Rao, K. S., 2008. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J. Med. Res.* 128, 545-556.
- Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C. S., Laws, S. M., Gandy, S. E., Martins, R. N., 2004. The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught? *Pharmacol. Res.* 50, 397-409.
- Walton, J. R., 2006. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 27, 385-394.

- Walton, J. R., 2009. Functional impairment in aged rats chronically exposed to human range dietary aluminum equivalents. *Neurotoxicology* 30, 182-193.
- Wang, X., Su, H., Copenhagen, L. D., Vaishnav, S., Pieri, F., Shope, C. D., Brownell, W. E., De Biasi, M., Paylor, R., Bradley, A., 2002. Urocortin-deficient mice display normal stress-induced anxiety behavior and autonomic control but an impaired acoustic startle response. *Mol. Cell Biol.* 22, 6605-6610.
- 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.
- Yumoto, S., Horinob, Y., Mokunob, Y., Kakimic, S., Fujii, K., 1996. Microprobe PIXE analysis of aluminium in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Nuclear Instr. Meth. Physics Res. Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 109-110, 362-367
- 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.



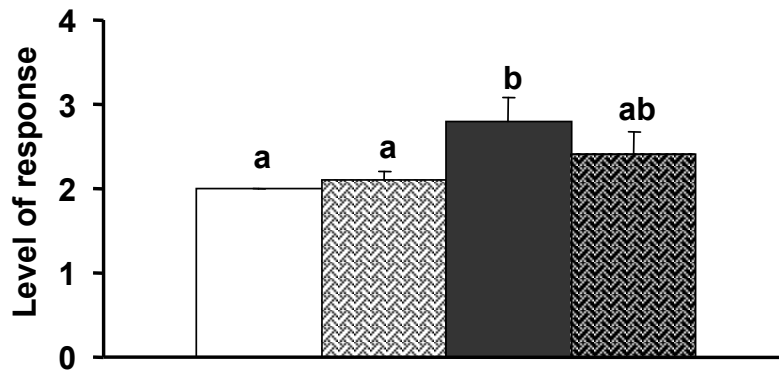
Table 1. Functional observational battery (FOB)

<b>Home cage</b>	<b>Observer's hand</b>	<b>Other measures</b>
Posture (M)	Initial response (M)	Approach response (M)
Arousal (M)	Hand reaction (M)	Touch response (M)
Rearing (N)	Salivation (M)	Click response (M)
Eating/drinking (N)	Lacrimation (M)	
Grooming (N)	Piloerection (Y/N)	
Climbing (N)	Fur appearance (Y/N)	
Abnormalities (D)	Palpebral closure (M)	

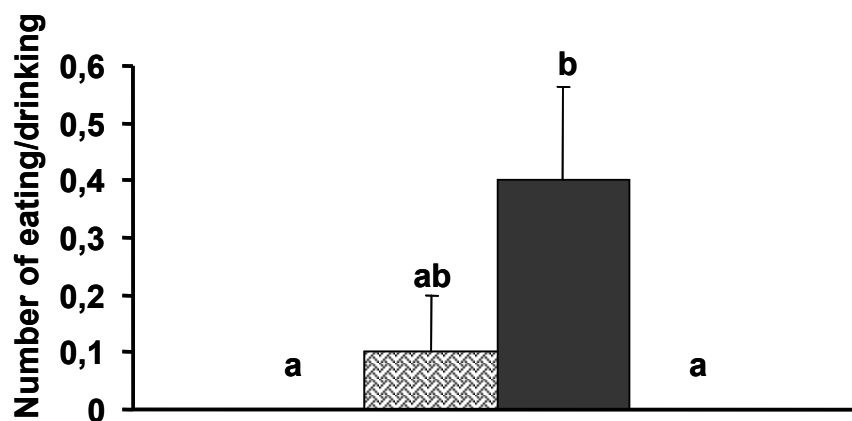
D = descriptive, M = measured value, N = number, Y/N = yes/no declaration

**Fig.1**

**A**



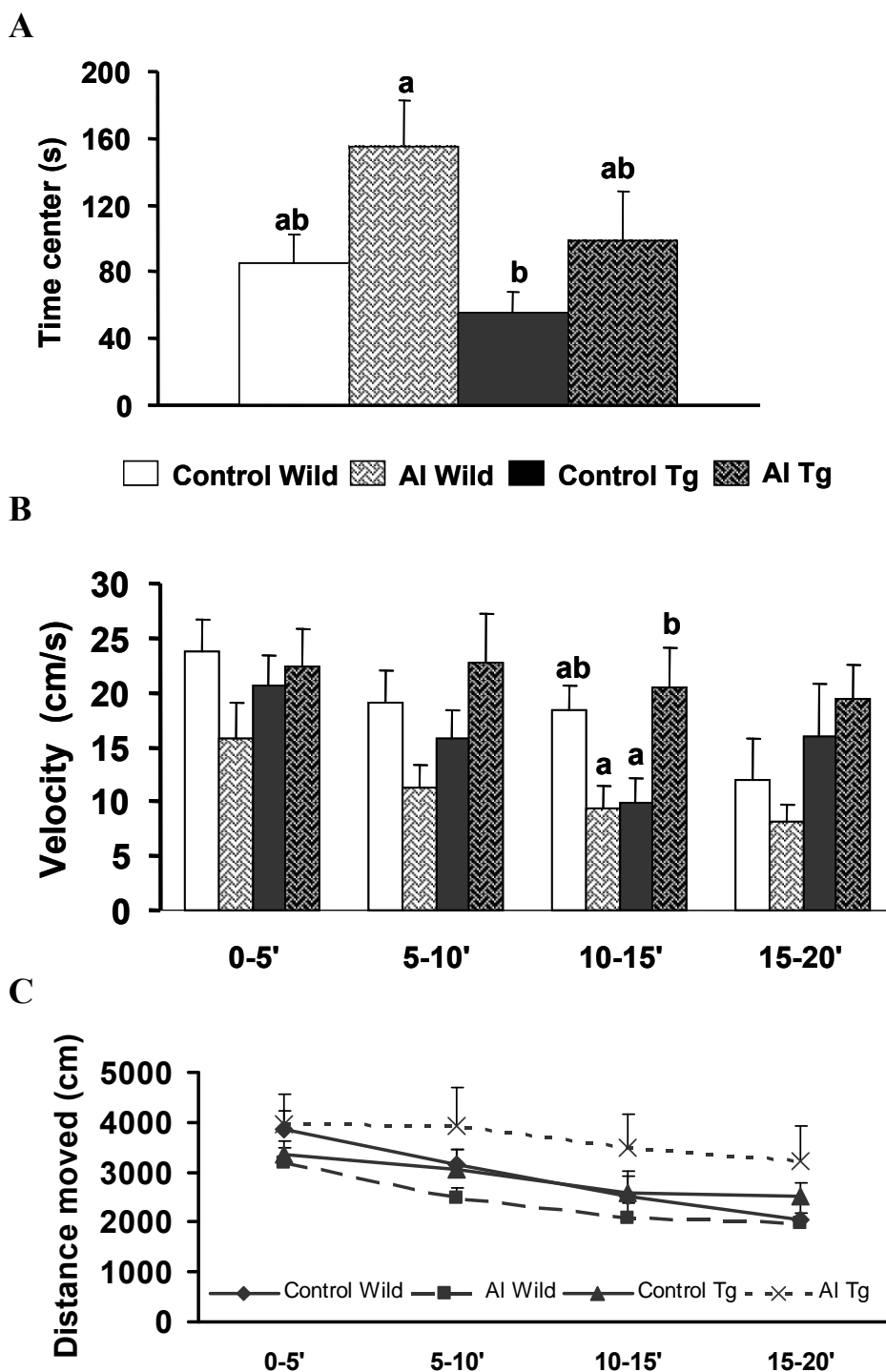
**B**



□ Control Wild    ▨ AI Wild    ■ Control Tg    ▩ AI Tg

**Fig. 1.** Arousal level (A) and eating/drinking behavior (B) of mice obtained from the Functional Observational Battery (FOB). Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between groups. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.

Fig. 2



**Fig. 2.** Time spent in the center of the open-field (A), velocity (B), and distance traveled (C) in the center of the open-field at different fractions of time over 20 minutes. Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between groups. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.

Fig. 3

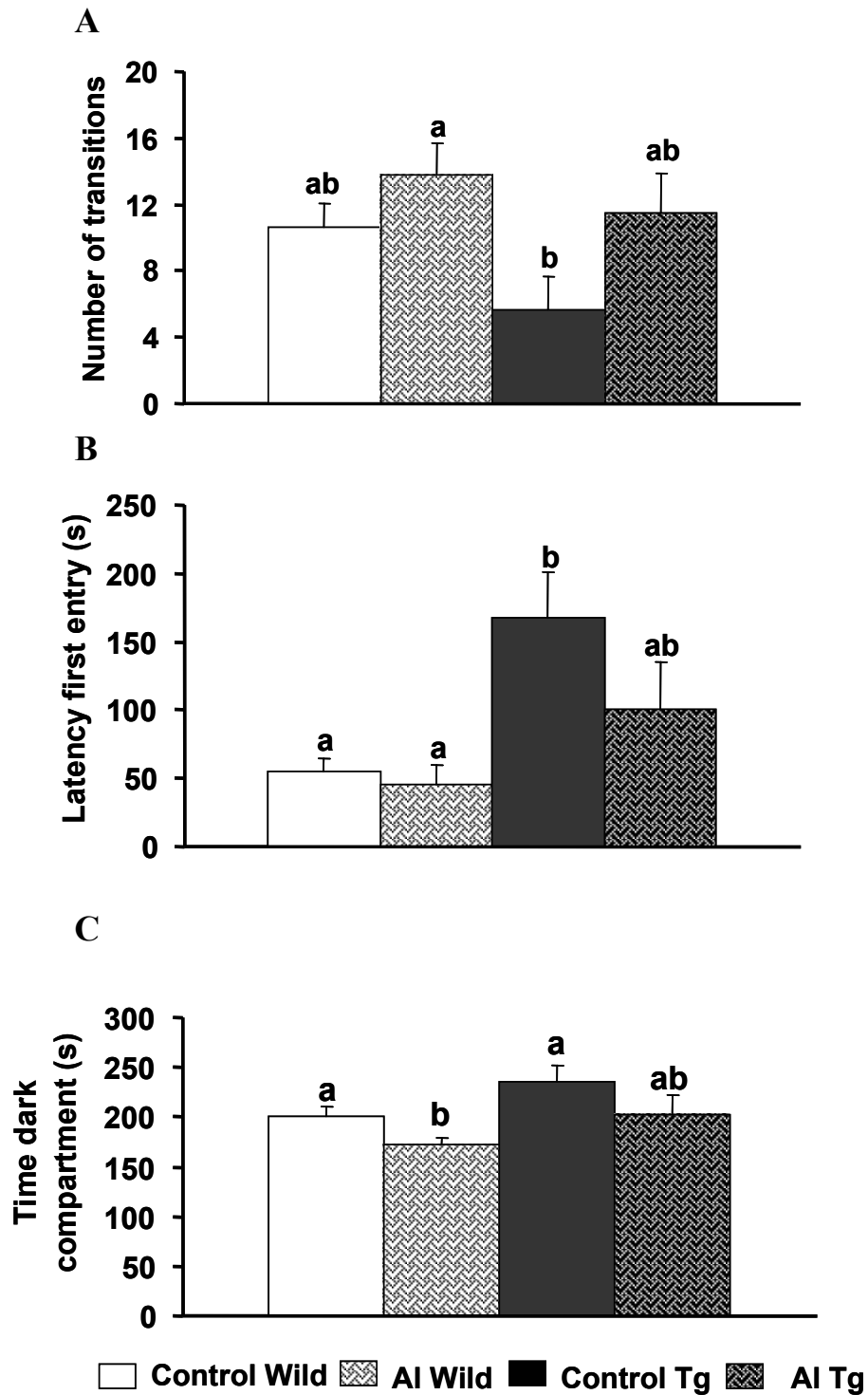


Fig. 3. Behavior in the light/dark box test: number of transitions between compartments (A) latency to the light compartment (B) and total time in the dark compartment (C). Different letters indicate significant ( $P < 0.05$ ) differences between groups. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.

Fig. 4

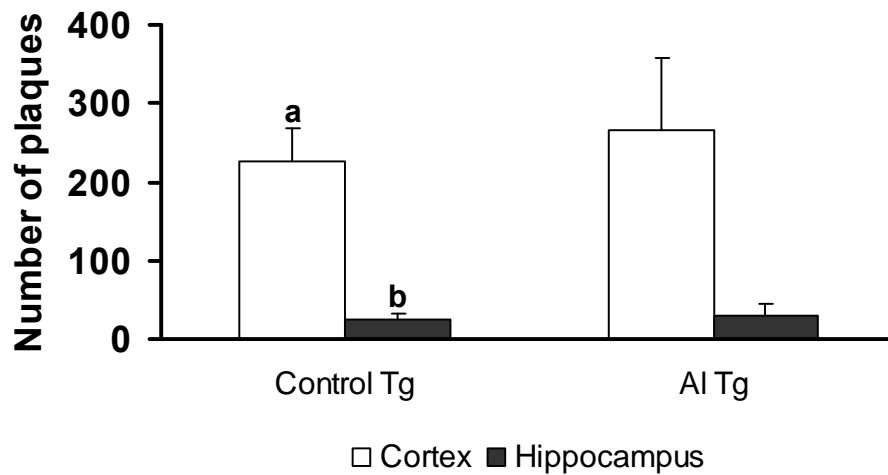


Fig. 4. Number of  $\beta$ -amyloid plaques in Tg2576 mice. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. Different letters (a,b) indicate significant differences between areas within the same group.

Fig. 5

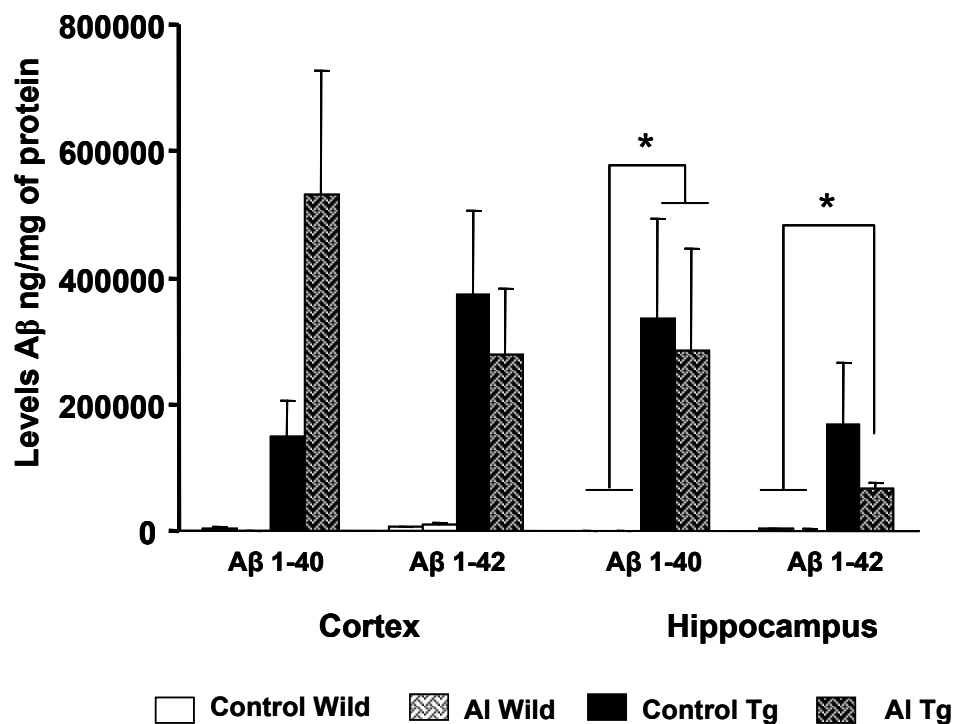
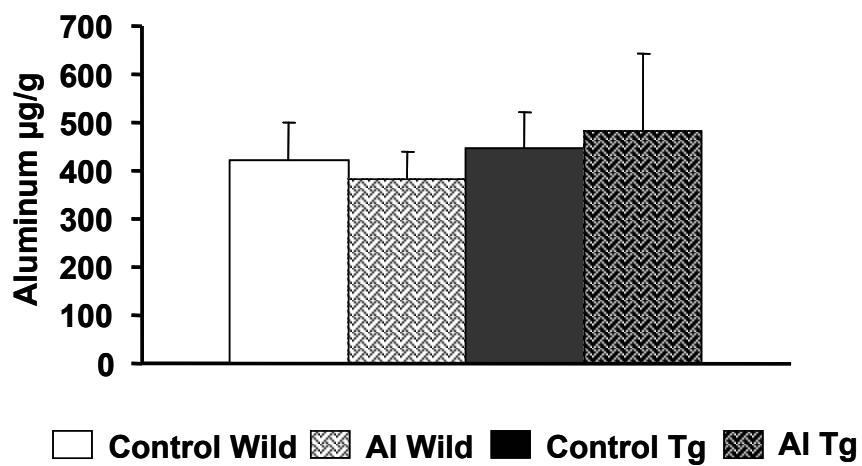


Fig. 5.  $\beta$ -amyloid (1-40) and (1-42) levels in cortex and hippocampus of mice. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. \* Significant differences at  $P < 0.05$ .

**Fig. 6**



**Fig. 6.** Aluminum accumulation in brain ( $\mu\text{g/g}$ ). Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M.



### 4.3 Fase experimental III

Finalment, la tercera fase experimental se centrava a avaluar els efectes de l'exposició a dosis elevades de lactat d'Al (11 mg/g de pinso) durant 9 mesos. En aquesta fase es va avaluar els processos cognitius (aprenentatge i memòria) d'animals vulnerables i no vulnerables en el laberint aquàtic de Morris utilitzant un protocol modificat per tal de trobar un model més acurat que ens permetés demostrar els efectes deleteris de l'Al en aquests processos. En línies generals aquest protocol va consistir en allargar els dies de la fase d'adquisició, disminuir el numero d'assajos en cada sessió i introduir un paret mòbil que eliminava possibles senyals intra-laberint. També es va estudiar la neurogènesi, així com els nivells i número de plaques de  $\beta$ -amiloide.

D'acord amb la hipòtesi de treball de l'estudi en aquesta fase experimental es van observar efectes nocius clars de l'Al tant a nivell cognitiu, en la neurogènesi i en els nivells de la proteïna  $\beta$ -amiloide 1-42. Pel que fa a l'aprenentatge en el laberint aquàtic, l'exposició al metall afecta de manera significativa l'execució de la població de ratolins transgènics. Tenint en compte la neurogènesi, l'exposició a dosis elevades d'Al durant 9 mesos va produir un increment de la proliferació en el grup d'animals no vulnerables genèticament exposats al metall i un augment dels nivells de proteïna  $\beta$ -amiloide 1-42 en el grup de ratolins transgènics.





**Prolonged oral aluminum exposure increases  $\beta$ -amiloyd and impairs memory in a mouse model of Alzheimer's disease**

**Diana Ribes<sup>a,b</sup>, Paloma Vicens<sup>a,b</sup>, José Luís Domingo<sup>b</sup>, Maria Teresa Colomina<sup>\*a,b</sup>**

*<sup>a</sup>Department of Psychology and Research Center in Behavioral Assessment (CRAMC), Universitat "Rovira i Virgili", Sescelades Campus, 43007 Tarragona, Spain;*

*<sup>b</sup>Laboratory of Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat "Rovira i Virgili", Sant Llorens 21, 43201 Reus, Spain*

Corresponding author: Maria Teresa Colomina

Address correspondence to this author at the Department of Psychology and Research Center in Behavioral Assessment (CRAMC), "Rovira i Virgili University", Sescelades Campus, 43007 Tarragona, Spain;

Tel: +34 977558075; Fax: +34 977 558088; E-mail: mariateresa.colomina@urv.cat

## **Abstract**

Epidemiological and clinical data indicate a potential link between Al exposure and Alzheimer's disease (AD). Recently, we showed limited effects of different Al doses given orally for 3 and 6 months, to a transgenic mouse model of AD, Tg2576. In the present study, the effects of a high dose of oral Al were evaluated in Tg2576 mice. Wild-type and Tg2576 mice received a diet supplemented with Al lactate at 0 and 11 mg/g for 300 days. At 15 months of age mice were evaluated for learning and memory in a modified water maze test, and subsequently mice were injected with bromodeoxyuridine to study cell proliferation, survival and differentiation in the hippocampus. A $\beta$  levels were also measured in brain cortex and hippocampus. Results showed an impaired retention in Al-exposed mice, an increased cellular proliferation in wild-type animals and an increase in A $\beta$ 1-42 levels in brain of Tg2576 exposed mice. These results indicate that exposure to high doses of Al impairs cognition and increases biochemical signs of AD.

**Keywords:** Alzheimer Disease; Aluminum; Mice; Beta-Amyloid Protein; Learning; Memory, Hippocampus; Neurogenesis

**Running Title:** Aluminm and Alzheimer's disease in Tg2576 mice

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by behavioural and personality changes, as well as a cognitive progressive impairment associated with the disease are well documented. Clinical phenotype, are accompanied by three main neuropathological hallmarks: diffuse loss of neurons; intracellular protein deposits, termed neurofibrillary tangles (NFT) consisting of hyperphosphorylated tau protein; and extracellular protein deposits termed amyloid (A $\beta$ ) or senile plaques, surrounded by dystrophic neurites (Leslie, 2002, Torreilles and Touchon, 2002).

In spite of the prominent amyloid cascade hypothesis, the etiologic role of amyloid in non familiar AD as the only age related-cause is questionable. In general it is accepted that several risk factors accumulated over years challenge the integrity of the brain and contributes together with  $\beta$ -amyloid dysfunction to the onset and progression of the disease. An important question is which are those environmental factors and to which extent are they contributing to the onset and progression of the disease? In this sense, some studies have focused on a putative link between dietary exposure to Aluminum (Al) and neurodegenerative disorders (Frisardi et al., 2010). This link is supported by a number of clinical (Wills and Savory, 1989, Yumoto et al., 2009) occupational (Riihimaki et al., 2000) and epidemiological evidences (Flaten, 1990, Rondeau et al., 2009). Moreover, some anatomopathological findings in the brain of AD patients (Walton, 2006, Yumoto et al., 2009) and some experimental studies (Pratico et al., 2002, Ribes et al., 2008, Walton and Wang, 2009, Ribes et al., 2010) have also provided links between Al and AD.

In recent years, the availability of transgenic mice models is providing new data to better understand the effects of environmental exposure to Al. In this sense, the Tg2576

mouse model was developed in 1996 (Hsiao et al., 1996), the model carries the double mutation K670M/N671L of the human APP gene (APP<sup>swe</sup>) which is responsible for an early familiar form of AD found in a Swedish family and has been the most widely used experimental AD model. The human form of the  $\beta$ -amyloid is more reactive, and more prone to form aggregates than the rat form when complexed to A $\beta$  (Drago et al., 2007).

Aluminum (Al), has a low absorption and a good renal elimination, and it is extensively used. However, some factors such as nutritional deficits and renal failure can contribute in increasing Al absorption and accumulation. Aluminum is a neurotoxic element that can contribute to cognitive deficits and dementia after accumulation in brain (Kawahara, 2005). However, it has not yet been established which are the levels needed to induce functional brain deficits (Domingo, 2006). It has also been reported that Al induces APP expression and aggregation of the A $\beta$  protein (Zatta et al., 2009), as well as disruption of synapse formation and remodelling (Colomina et al., 2002, Pratico et al., 2002, Banks et al., 2006) among neurons. Moreover, Al has been detected in neuritic plaques and tangle-bearing neurons, suggesting the involvement of this metal in the pathogenesis of AD (Miu et al., 2003, Yumoto et al., 2009).

Adult neurogenesis is modulated by a very wide ranged of intrinsic (growth factors, neurotransmitters, hormones, etc.) and extrinsic (learning, enriched environment, etc.) factors (Abrous et al., 2005, Ming and Song, 2005, Lledo et al., 2006). In neurodegenerative diseases, neither the course of neurogenesis during the neurodegenerative processes nor the functional significance of neurogenesis in neurodegeneration is well understood. Some studies point at a possible compensatory mechanisms by which AD patients increase cell proliferation at early stages (Brazel and Rao, 2004, Jin et al., 2004a). Indeed, An increase in cell proliferation have also been

reported in relation to acute brain injuries such as ischemia, stroke, seizures or trauma (Zhang et al., 2008 )

In recent studies performed in our laboratory, we found subtle spatial learning impairments by either low or high doses of Al administered orally for 3 or 6 months to Tg2576 mice (Ribes et al., 2008, Ribes et al., 2010). In those experiments, Al exposure did not increase  $\beta$ -amyloid levels in brain while cell proliferation was increased only in transgenic mouse at 11 months of age after 3 months of low doses of Al (Ribes et al., 2008). The aim of the present study was to assess in Tg2576 mice whether Al could accelerate the onset of AD. Tg2576 animals and their respective control wild-type mice were exposed to a high Al dose for a prolonged period of time and the changes in cognitive functions (learning and memory), A $\beta$  levels and hippocampal neurogenesis were measured.

## **Materials and methods**

### **Animals and Treatment**

After authorization from Taconic Europe (Ejby, Denmark), Tg2576 male mice were bred with C57BL6/SJL females. At 2 months of age, genotyping of the offspring for the APP transgene was performed using DNA obtained from tail biopsies. Polymerase Chain Reaction (PCR) products were sequenced to confirm the presence of human APP DNA sequence in the offspring. Male mice were then separated into transgenic and wild-type. Transgenic (Tg2576) and wild-type male mice were individually housed in plastic cages in an animal room, which was maintained at a temperature of  $22 \pm 2$  °C, a relative humidity of  $50 \pm 10\%$ , and a 12-h light/dark automatic light cycle (light: 08:00–

20:00 h). All animals were allowed free access to a typical rodent chow (Harlan, Barcelona, Spain) and tap water until 5 months of age. At that time, control mice received rodent chow, while Al-treated animals were fed for 300 days with rodent chow supplemented with Al lactate at 0 and 11 mg/g of food, which means 0 and 1.11 mg of Al/g, respectively. Aluminum concentrations were measured in the regular chow (27.1  $\mu\text{g/g}$ ), in the supplemented chow (1107.5  $\mu\text{g/g}$ ), and in tap water (14.0  $\mu\text{g/l}$ ). The experimental groups were distributed as follows: control wild-type (Control Wild, n=16), Al-treated wild (Al Wild, n=12), control transgenic (Control Tg, n=12), and Al-treated transgenic (Al Tg, n=12). Body weight, food intake, and water consumption were measured once a month during the entire treatment period. The protocols of the study were approved by the Animal Care and Use Committee of the “Rovira i Virgili” University (Tarragona, Spain).

### **Morris Water Maze**

After 9 months of Al exposure (5 months of age at the beginning of testing), spatial learning in a Morris water maze (MWM) was evaluated. Animals were 14 months old at the end of the behavioral testing. The water maze consisted of a circular tank (diameter, 1m; high, 60 cm), divided virtually into four quadrants. An escape platform (10 cm of diameter) was located 1 cm below the water surface in the target quadrant. The acquisition period was ten days. Each daily training session consisted of two training trials with four pseudo-random start positions. If a subject did not find the platform in 120 sec, it was guided to the platform by the experimenter, remaining on the platform for 30 sec. The time inter-trials was 1.30 hr. To avoid proximal cues and prevent egocentric learning, an internal mobile wall was added to the maze, and the wall was randomly moved between trials. To evaluate the retention of the task, 3 probe

trials were carried out before the training session on acquisition days 5, 7, 9 and another one 72 hours after the last training session. The probe trials consist in 60 sec of free swim without the escape platform.

Animal performance was recorded by a video camera placed above the maze. Data were analyzed by a computer assisted tracking system Etho-Vision<sup>®</sup> (Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands). The latency to find the escape platform, distance traveled, and swim velocity during the training sessions were measured. During the probe trials, total time spent in the target quadrant, and the time spent in the other quadrants were measured to compare the time searching in the target quadrant to the average time spent in the other quadrants.

### **Bromo-Deoxyuridine Administration and Sample Collection**

To determine cell proliferation, survival, and differentiation in the dentate gyrus, two days after behavioral testing, (6-8 mice for group) were intraperitoneally injected with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) (Sigma, Steinheim, Germany) at 100 mg/kg/day during two consecutive days. One and 28 days after the last BrdU injection, animals were anesthetized with xilacine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg), and perfused transcardially with 0.1M phosphate-buffered saline (PBS). Brains were rapidly removed from the skulls and divided coronally by free hand into three sections. The medial section containing the whole hippocampus formation was post-fixed for one day at 4°C in 4% paraformaldehyde. Brains were transferred to 30% sucrose in PBS solution for 48 hr at 4°C and then snap frozen in isopentane. Serial coronal sections, 40 µm thick, were cut with a cryostat and collected according to a fractionator principle (West et al., 1991). Samples were stored at -20°C in a cryoprotection buffer (40% phosphate buffer 0.1M, 30% glycerol, and 30% ethylene glycol) until immunostaining.



## **Immunohistochemistry**

One out of six sections was taken for biotinylated-BrdU immunostaining. Free-floating coronal sections of brain were rinsed in Tris-buffered saline (TBS) and inactivated for endogen phosphatase activity in 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TBS. Sections were then treated for DNA denaturation incubating in 2M HCl at 37°C and rinsed in 0.1M sodium borate buffer. Sections were blocked in TBS-Plus containing 3% normal goat serum and 1% Triton-X in TBS for 30 min. Antibody against BrdU (Serotec, Oxford, UK) was diluted 1:500 in blocking buffer and incubated overnight at 4°C. Tissue sections were then washed with TBS-Plus and incubated with secondary antibody (biotinylated anti-rat IgG, 1:500, Vector Laboratories, Burlingame, USA) for 2 h. After additional washes, the secondary antibody was detected using the avidin-biotin complex reaction (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Diaminobenzidine (Vector Laboratories, Burlingame, USA) was used as chromogen. Sections were thoroughly washed, mounted, and cover slipped.

For triple-labeling immunofluorescence primary BrdU (Serotec, Oxford, UK), NeuN (Chemicon International, Temecula, USA) and GFAP (Sigma, Saint Louis, USA) antibodies were used. After pre-treatment (see above) and a blocking step with TBS-Plus containing 3% donkey serum, sections were incubated in a mixture of antibodies against BrdU (1:500), NeuN (1:200), and GFAP (1:160) for 48 h at 4°C. After washing in TBS and TBS-Plus, a cocktail of secondary antibodies (1:250) was applied for 4 h at room temperature in order to detect BrdU, NeuN, and GFAP (Alexa Fluor 488, 568 and 660; Fisher Bioblock Scientific, Madrid, Spain). Sections were again washed, mounted, and cover slipped.

One out of every six sections (a total of ten coronal sections per mouse) were taken for double immunofluorescence staining for A $\beta$  and GFAP labeling. The sections were rinsed in TBS and inactivated for endogen phosphatase activity in 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TBS. Sections were blocked in TBS-Plus containing 3% normal goat serum and 1% Triton-X in TBS for 30 min. The antibodies monoclonal anti-A $\beta$  (1:500, Sigma, Saint Louis, USA) and GFAP (1:250, Sigma, Saint Louis, USA) with blocking buffer were incubated for 48 hr at 4°C. To detect  $\beta$ -amyloid plaques and GFAP (Alexa Fluor 568 and 660; Fisher Bioblock Scientific, Madrid, Spain), a cocktail of secondary antibodies (1:250) was then applied for 4 hr at room temperature. Sections were again washed, mounted and coverslipped.

### **Quantification of BrdU Positive Cells**

Data for proliferation were obtained by using methods of unbiased stereology. The total number of BrdU positive cells in the granular cell layer and hilus of the bilateral entire hippocampus were exhaustively counted in one out of 6 serial coronal sections of the brain. The set of selected sections represents one-sixth of the whole hippocampus, being representative of the total hippocampus. Positive cells were counted by means of optic microscopy (Olympus, CH20) through a 100 $\times$  objective. Cells in the uppermost focal plane were discarded to avoid counting twice cells cut in two parts (Encinas and Enikolopov, 2008). The estimation of the total number of BrdU positive cells was obtained by multiplying the total number counted by 6, and reported as total number of cells.

To study survival and differentiation, fluorescence signals were observed by means of Nikon T2000E laser-scanning confocal microscopy. The total number of BrdU positive cells, as well as the total number of BrdU-NeuN and BrdU-GFAP cells in

dentate gyrus, and hilus of both right and left hippocampus, were exhaustively counted in one out of 6 serial coronal sections. Estimation of the total number of BrdU, BrdU-NeuN and BrdU-GFAP was obtained by multiplying each value by 6. Data are here presented as the percentage of BrdU-NeuN or BrdU-GFAP out of the total number of BrdU positive cells.

### **Quantification of A $\beta$ plaque**

The total number of A $\beta$  deposit was counted in parietal and temporal cortex surrounding hippocampus and in hippocampus of each animal. The total number of plaques in the entire hippocampus was exhaustively counted in one out of 6 serial coronal sections of the brain. The set of selected sections represents one-sixth of the whole hippocampus, being representative of the total hippocampus and one-sixth of the whole parietal and temporal cortex. Plaques were counted by means of Nikon T2000E laser-scanning confocal microscopy. Plaques in the uppermost focal plane were discarded to avoid counting twice plaques cut in two parts (Encinas and Enikolopov, 2008). The estimation of the total number of plaques was obtained by multiplying the total number counted by 6, and reported as total number of plaques.

### **A $\beta$ quantification**

Cerebral cortical tissue (n=10-12 per group) were homogenized in 0.8 ml of 5M guanidine HCl and 50 mM tris buffer, and centrifuged at 100,000  $\times$  g for 1 hr at 4 °C. The  $\beta$ -amyloid peptides present in the supernatant were analyzed using a sandwich ELISA system for either A $\beta$ 1-40 levels or A $\beta$ 1-42 levels commercially obtained from Biosource (Barcelona, Spain), according to the manufacturer's protocol.

## Statistics

Behavioral data were analyzed by a two-way ANOVA (genotype x AI treatment). Repeated measures multivariate analysis of variance using the day as the within-subject factor, were also used when appropriate. One-way ANOVA and post-hoc Tukey test were used to analyze differences between groups. Analysis for variance homogeneity using a Levene test was performed. Kruskal-Wallis test, and the Mann-Whitney U-test where also used when necessary. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

### Spatial Learning in the Water Maze

#### Acquisition

Acquisition of the water maze task over days was analyzed by a two-way ANOVA for repeated measures in order to assess any effect or interactions of AI exposure and genotype factors, on the escape latency, and distance traveled to find the platform (Figures 1 and 2, respectively). An overall effect of genotype [ $F(1,48)= 10.808$ ,  $p = 0.002$ ] and significant interactions between the acquisition day, genotype and treatment [ $F(9,40)= 3.810$   $p = 0.002$ ] were observed on escape latency. An overall effect of genotype [ $F(1,48)= 14.554$ ,  $p < 0.001$ ], as well as significant interactions between acquisition day and genotype [ $F(9,40)= 2.943$   $p = 0.009$ ], acquisition day and treatment [ $F(9,40)= 3.075$   $p = 0.007$ ] and acquisition day, genotype and treatment [ $F(9,40)= 2.776$   $p = 0.013$ ] on swam distance to the platform were also observed.

Since the variances were not homogeneous, we used the nonparametric Kruskal-Wallis test to analyze differences between groups in each day of the acquisition period. Significant differences between control wild-type and control transgenic group in escape latency were noted from day 5 to the end of the acquisition period. In turn,

differences between control wild-type and transgenic mice exposed to Al were found from acquisition day 2 to the end of the acquisition period (Figure 1).

### ***Insert Figure 1***

With respect to the distance traveled, the nonparametric Kruskal-Wallis test also showed differences between wild-type control group and the transgenic groups for the whole acquisition period (except on day 1). In this parameter, exposed wild-type mice also showed differences when compared to transgenic mice exposed to Al from days 3 to 7 (Figure 2).

### ***Insert Figure 2***

It is important to note that during the acquisition period, differences are mainly related to genotype effects. However, Al-exposed mice showed a trend towards a worse performance during acquisition when compared to their respective controls. This effect of the treatment is supported by a significant interaction between genotype and treatment observed in repeated measures analysis.

### **Retention**

To evaluate retention of the task, various probe trials without the platform were performed before acquisition sessions on days 5, 7, 9 and 72 hr after the last acquisition session. On day 5, some differences between groups were noted. A significant retention was observed by acquisition day 9, twenty four hours after the 16<sup>th</sup> training trial (Figure 3).

A probe trial performed on acquisition day 5, 24 hr after the 8<sup>th</sup> acquisition trial, showed some differences on retention. A two-way ANOVA (Al treatment x genotype) showed significant treatment effects on distance moved in the target quadrant [ $F(1,48)= 4.231, p = 0.045$ ]. A one-way ANOVA showed significant differences between groups on distance moved in the target quadrant [ $F(3,48)= 3.172, p = 0.032$ ], the post-hoc Tukey's test indicated significant differences between control wild-type and transgenic mice exposed to Al. On acquisition day 7, 24 hr after the 12th acquisition trial, all groups performed similarly. No differences in time or distance were observed. Significant treatment effects were noted again on acquisition day 9. A two-way ANOVA (Al × genotype) showed an overall effect of treatment in the time searching in the target quadrant [ $F(1,48)= 4.579, p = 0.037$ ]. This effect consisted in a worse retention in Al-exposed mice, but no significant differences between groups were observed (Figure 3). No other effects, either of treatment or genotype, were detected. A paired *T*-test was used to analyze differences in time and distance moved in the target quadrant compared to the other quadrants. Regarding time, differences were found in both control wild-type ( $p = 0.024$ ) and control transgenic ( $p < 0.001$ ) mice, while Al-exposed groups did not show significant differences indicating a poorer performance. For distance, significant differences were observed in control wild-type ( $p = 0.015$ ), Al-exposed wild-type ( $p = 0.016$ ) and control transgenic ( $p = 0.002$ ) mice.

***Insert figure 3***

With regard to the last probe trial performed 72 hr after acquisition, no effects of genotype or Al treatment were observed on distance or time spent in the target quadrant. However, differences in time and distance traveled were noted when the data recorded

in the target quadrant were compared by a paired *T*-test with the data in the other quadrants. With respect to time, differences were observed in control wild-type group ( $p = 0.024$ ) and Al-treated wild-type mice ( $p = 0.037$ ), while in the distance traveled differences were noted in control wild-type group ( $p = 0.003$ ), control transgenic mice ( $p = 0.049$ ), and Al-exposed wild-type mice ( $p = 0.025$ ) (Figure 4). The only group not significantly spending more time or covering more distance in the target quadrant was that of transgenic Al-exposed mice.

#### ***Insert figure 4***

Differences on swimming velocity in the target quadrant and in the whole pool were analyzed by a two-way ANOVA (Al treatment x genotype). Regarding swim velocity on the target quadrant during probe trials, a two-way ANOVA (Al treatment x genotype) showed treatment effects on acquisition day 5 [ $F(1,48) = 7.179$ ,  $p = 0.010$ ], and 72 hr after the last acquisition session [ $F(1,48) = 7.511$ ,  $p = 0.009$ ]. An interaction between genotype and treatment was also observed on day 5 [ $F(1,48) = 5.962$ ,  $p = 0.018$ ]. Genotype effects were also observed for swim velocity on the probe trial performed on acquisition day 7 [ $F(1,48) = 5.682$ ,  $p = 0.021$ ]. Moreover, significant differences between groups in swim velocity were observed on acquisition day 5 and 72 hr after the last acquisition session. These differences were mainly due to a low velocity in the target quadrant in transgenic Al-exposed mice (Figure 5).

#### ***Insert figure 5***

### **Neurogenesis**

## Proliferation

Data analysis by two-way ANOVA (Al treatment × genotype) showed an effect of genotype [F(1,14)= 10.028, p= 0.009], Al treatment [F(1,14)= 10.028, p= 0.020] and an interaction between Al treatment and genotype ([F(1,14)= 10.028, p= 0.009]). ANOVA test revealed differences among groups [F(3,14)= 9.952, p= 0.002]. Post-hoc Tukey test showed that Al-treated wild-type mice had more proliferation than the remaining groups (Figure 6).

### *Insert figure 6*

## Survival and differentiation

The results of the survival and differentiation of new born cells in animals sacrificed 28 days after the last injection of BrdU showed neither effects of any factor (Al/genotype) or interactions, nor significant differences between groups (Table 1) (Figure 7).

### *Insert figure 7*

## Aβ levels and Aβ plaque

A significant increase in Aβ42 levels measured by ELISA were detected in brain cortex samples [F(1,21)= 10.149, p= 0.005] of transgenic exposed mice, while no significant differences were observed in Aβ40 levels (Figure 8).. Regarding plaque quantification in brain cortex a non significant increase was observed in cortex of transgenic exposed mice. (Figure 9).

### *Insert figure 8*

### *Insert figure 9*



## Discussion

The putative Al role in neurodegeneration is of notable concern considering its natural abundance, as well as its practically unavoidable human exposure in industrialized and developing countries. However, the investigation on the potential role of this metal in neurodegeneration shows evidences supporting or discarding this role. (Zatta et al., 2002, Zatta et al., 2009). The use of mice models of neurodegeneration can provide additional information to clarify Al involvement in those processes.

In previous studies performed in our laboratory, we evaluated the reference memory in Tg2576 mice using a water maze task. The experimental procedures have been progressively adapted to increase the sensitivity of the task (Ribes et al., 2008, Ribes et al., 2010). In the present investigation, we used an internal mobile wall surrounding the inner wall in the maze, to avoid proximal cues and to force the animal to generate a cognitive map using distal cues. Moreover, the trial duration (120 sec) and the number of trials (two per day) together with a 10 day acquisition phase make the task more sensitive. In addition, retention was evaluated in a series of trials performed during acquisition and at the end of the task. The present results in the acquisition phase of water maze showed that Tg2576 mice learned the task worse than wild-type animals did. This is consistent with the results found in previous studies performed in our laboratory, in which Tg2576 mice were tested at 9 and 13 months of age (Ribes et al., 2008, Ribes et al., 2010), as well as with those reported by other authors (Watanabe et al., 2009). In the current study, we also observed interesting significant genotype treatment interactions, which indicate that Al affects the acquisition of the task in terms of worsening Al-exposed transgenic mice performance. On the other hand, we also observed Al effects on the retention of the task, being Al-exposed Tg2576 mice the

most affected these Al effects on retention were also observed after Al exposure to lower doses and shorter exposures (Ribes et al., 2008, Ribes et al., 2010).

In spite of the genetic background and the neuropathological signs of AD, Tg2576 mice not always showed impairment in reference memory. King and Arendash (2002) found only subtle changes in reference memory in the water maze in Tg2576 evaluated at different ages (for instance, no differences in retention at 3, 9, 14 and 19 months were observed). Moreover, a recent review of data determining the extent of memory impairment in Tg2576 mice shows that APP(SWE) mice exhibit an age-dependent decline in memory. However, the effect was rather small when compared to non-transgenic littermates (Reed et al., 2010). Our results in mice evaluated at 16 months of age showed consistent genotype differences between control wild-type and control transgenic groups over the acquisition period. Results obtained along the different probes performed during the acquisition period showed some different effects over days. It is interesting to note that there were some retention differences on day 5 indicating that both control wild-type and control transgenic mice are better than Al-exposed mice at early stages of acquisition. However, on day 7 all groups performed similarly in the probe trial and treatment effect was not observed. On day 9, results were very similar to those observed 72 hr after the acquisition period, indicating some deficits in Al-exposed transgenic mice, which are the only group not showing a significant retention of the task when the distances in target quadrant were analyzed. This result is influenced by the swim velocity in the target quadrant, which is low in Tg2576 mice exposed to Al. According to the literature, a decreased velocity could be associated with systematic, nonspatial strategies, making this search less effective than a spatial strategy (Brody and Holtzman, 2006). Other authors suggested that a diminished velocity would indicate diminished motivation (Lubbers et al., 2007) or motor impairments (Block et al., 1993,

D'Hooge et al., 1997). However, since swim velocity in the whole pool was only significantly affected by genotype in one of the probe trials performed, with no differences between groups, it does not seem to be a consequence of either motor impairment or poor motivation.

Taken together the current data on retention probes, it can be seen that both Al-exposed wild-type mice and Al-exposed transgenic mouse are able to remember after massive learning. Control groups, either transgenic or wild-type, showed good retention scores on day 9, although Al-exposed mice needed more trials to achieve similar scores. These results are in agreement with those observed in a previous study (Ribes et al., 2010), corroborating the deleterious effect of Al in reference memory. They can also be comparable to those observed in Al-exposed welders, where a neuropsychological test showed negative correlations between Al in blood and urine and test scores in visuospatial and attentional tasks (Akila et al., 1999, Riihimaki et al., 2000). Therefore, based on the results of our studies and data from other authors, it seems that a high exposure to Al is necessary to induce retention deficits.

On the other hand, the current results indicated an increased cellular proliferation in brain hippocampus of mice exposed to Al for a prolonged period of time. An interesting temporal pattern can be observed analyzing together results obtained in previous experiments on Al and neurogenesis (Ribes et al., 2008, Ribes et al., 2010) and the present one. While low doses of Al for a limited (3 months) exposure period increased neurogenesis in Tg2576 Al-treated mice, at higher Al doses for a period of exposure of 6 months showed a trend towards an increase in Al-exposed wild-type mice. In this study, when Al exposure occurred for a period of 9 months, a significant increase in cell proliferation in wild-type mice exposed to Al was observed. A plausible interpretation for these results could be that proliferation acts as a transient compensatory mechanism.

Interestingly, in spite of significant differences in proliferation, survival and neuron differentiation 28 days later were very similar between groups. It is worthy to note the presence of new cells expressing GFAP is evident only in A $\beta$ -exposed mice either wild-type or Tg2576, supporting a reactive astroglia response in these groups. In this sense the exposure of primary human cultured cells to very low doses of A $\beta$  have been shown to contribute to inflammatory signaling pathway (Pogue et al., 2009). Previous studies found that neurogenesis is increased in some AD stages (Jin et al., 2004a, Jin et al., 2004b, Yu et al., 2009), in fact A $\beta$  is also implicated in inflammatory processes (Pogue et al., 2009). Moreover, certain acute brain injuries such as ischemia, hypoxia, seizures, and trauma increase neurogenesis (Kokaia and Lindvall, 2003, Rice et al., 2003, Itoh et al., 2005, Overstreet-Wadiche et al., 2006, Qiu et al., 2007) suggesting that neurogenesis may act as a protective mechanism for the brain. In this sense, increased neurogenesis in young adult Tg2576 mice, before the onset of AD functional deficits, as well as a reduced neurogenesis in older animals have been reported (Lopez-Toledano et al., 2010). It has also been suggested the increased neurogenesis at young ages might be an early sign or neural marker of AD, which was detectable long before other harmful manifestation of the disease (Lopez-Toledano et al., 2010).

It is possible that the increase in the phase of cell proliferation observed in A $\beta$ -exposed mice can be due to a compensatory mechanism of the system to the harmful A $\beta$  effects (which, as above discussed, would be able of altering various structures/biochemical processes), mechanism to fail in group genetically susceptible to developing Alzheimer's disease. This compensatory mechanism would lead A $\beta$ -exposed wild-type animals to show a learning set and memory similar to its control group.

In the present study, we also found a significant increase in A $\beta$  levels in Tg2576 mice exposed to A $\beta$ . This finding is in agreement with results of a previous study by Pratico

(Pratico et al., 2002). Compared with our recent investigations (Ribes et al., 2008), it would indicate that both, a high dose of oral Al and a prolonged exposure, are necessary to obtain such increase. Several authors have provided data on Al and A $\beta$  interactions that could explain such increase (Exley, 2006, Zatta et al., 2009).

In summary, the results of this study show that Al induces retention deficits, produces transient reactive reaction in brain in terms of cellular proliferation, and when sufficient doses are administered for a long period of time, it may also increase A $\beta$  levels in brain. Our results provided evidences supporting an Al role in both cognitive impairment and the progression of AD at later stages.

### **Acknowledgements**

The present research was supported by the “Fondo de Investigación Sanitaria FIS” through grant number PI041673 and from the SEJ2006-15628-C02-02 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

### **References**

- Abrous, D. N., Koehl, M. and Le Moal, M., 2005. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev.* 85, 523-569.
- Akila, R., Stollery, B. T. and Riihimaki, V., 1999. Decrements in cognitive performance in metal inert gas welders exposed to aluminium. *Occup Environ Med.* 56, 632-639.
- Banks, W. A., Niehoff, M. L., Drago, D. and Zatta, P., 2006. Aluminum complexing enhances amyloid beta protein penetration of blood-brain barrier. *Brain Res.* 1116, 215-221.
- Block, F., Kunkel, M. and Schwarz, M., 1993. Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats. *Neurosci Lett.* 149, 126-128.
- Brazel, C. Y. and Rao, M. S., 2004. Aging and neuronal replacement. *Ageing Res Rev.* 3, 465-483.
- Brody, D. L. and Holtzman, D. M., 2006. Morris water maze search strategy analysis in PDAPP mice before and after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 197, 330-340.

- Colomina, M. T., Roig, J. L., Sanchez, D. J. and Domingo, J. L., 2002. Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain. *Neurotoxicology*. 23, 775-781.
- D'Hooge, R., Nagels, G., Franck, F., Bakker, C. E., Reyniers, E., Storm, K., Kooy, R. F., Oostra, B. A., Willems, P. J. and De Deyn, P. P., 1997. Mildly impaired water maze performance in male *Fmr1* knockout mice. *Neuroscience*. 76, 367-376.
- Domingo, J. L., 2006. Aluminum and other metals in Alzheimer's disease: a review of potential therapy with chelating agents. *J Alzheimers Dis*. 10, 331-341.
- Drago, D., Folin, M., Baiguera, S., Tognon, G., Ricchelli, F. and Zatta, P., 2007. Comparative effects of A $\beta$ (1-42)-Al complex from rat and human amyloid on rat endothelial cell cultures. *J Alzheimers Dis*. 11, 33-44.
- Encinas, J. M. and Enikolopov, G., 2008. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol*. 85, 243-272.
- Exley, C., 2006. Aluminium and iron, but neither copper nor zinc, are key to the precipitation of beta-sheets of A $\beta$ <sub>42</sub> in senile plaque cores in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 10, 173-177.
- Flaten, T. P., 1990. Geographical associations between aluminium in drinking water and death rates with dementia (including Alzheimer's disease), Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis in Norway. *Environ Geochem Health*. 12, 152-167.
- Frisardi, V., Solfrizzi, V., Capurso, C., Kehoe, P. G., Imbimbo, B. P., Santamato, A., Dellegrazie, F., Seripa, D., Pilotto, A., Capurso, A. and F., P., 2010. Aluminum in the diet and Alzheimer's disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment. *J Alzheimers Dis*. 20, 17-30.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. and Cole, G., 1996. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 274, 99-102.
- Itoh, T., Satou, T., Hashimoto, S. and Ito, H., 2005. Isolation of neural stem cells from damaged rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *Neuroreport*. 16, 1687-1691.
- Jin, K., Galvan, V., Xie, L., Mao, X. O., Gorostiza, O. F., Bredesen, D. E. and Greenberg, D. A., 2004a. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 13363-13367.
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C. and Greenberg, D. A., 2004b. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 343-347.
- Kawahara, M., 2005. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis*. 8, 171-182; discussion 209-115.
- King, D. L. and Arendash, G. W., 2002. Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav*. 75, 627-642.
- Kokaia, Z. and Lindvall, O., 2003. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*. 13, 127-132.
- Leslie, R. A., 2002. Imaging Alzheimer's disease in vivo: not so implaque-able anymore. *Trends Neurosci*. 25, 232-233.
- Lopez-Toledano, M. A., Ali Faghihi, M., Patel, N. S. and Wahlestedt, C., 2010. Adult neurogenesis: a potential tool for early diagnosis in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*. 20, 395-408.

- Lubbers, M. E., van den Bos, R. and Spruijt, B. M., 2007. Mu opioid receptor knockout mice in the Morris Water Maze: a learning or motivation deficit? *Behav Brain Res.* 180, 107-111.
- Lledo, P. M., Alonso, M. and Grubb, M. S., 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 7, 179-193.
- Ming, G. L. and Song, H., 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 28, 223-250.
- Miu, A. C., Andreescu, C. E., Vasiu, R. and Olteanu, A. I., 2003. A behavioral and histological study of the effects of long-term exposure of adult rats to aluminum. *Int J Neurosci.* 113, 1197-1211.
- Overstreet-Wadiche, L. S., Bromberg, D. A., Bensen, A. L. and Westbrook, G. L., 2006. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J Neurosci.* 26, 4095-4103.
- Pogue, A. I., Li, Y. Y., Cui, J. G., Zhao, Y., Kruck, T. P., Percy, M. E., Tarr, M. A. and Lukiw, W. J., 2009. Characterization of an NF-kappaB-regulated, miRNA-146a-mediated down-regulation of complement factor H (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells. *J Inorg Biochem.* 103, 1591-1595.
- Pratico, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M., 2002. Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice. *Faseb J.* 16, 1138-1140.
- Qiu, L., Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Eriksson, P. S., Nilsson, M., Cooper-Kuhn, C. M., Kuhn, H. G. and Blomgren, K., 2007. Less neurogenesis and inflammation in the immature than in the juvenile brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27, 785-794.
- Reed, M. N., Liu, P., Kotilinek, L. A. and Ashe, K. H., 2010. Effect size of reference memory deficits in the Morris water maze in Tg2576 mice. *Behav Brain Res.* 212, 115-120.
- Ribes, D., Colomina, M. T., Vicens, P. and Domingo, J. L., 2008. Effects of oral aluminum exposure on behavior and neurogenesis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 214, 293-300.
- Ribes, D., Colomina, M. T., Vicens, P. and Domingo, J. L., 2010. Impaired spatial learning and unaltered neurogenesis in a transgenic model of Alzheimer's disease after oral aluminum exposure. *Curr Alzheimer Res.* 7, 401-408.
- Rice, A. C., Khaldi, A., Harvey, H. B., Salman, N. J., White, F., Fillmore, H. and Bullock, M. R., 2003. Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 183, 406-417.
- Riihimaki, V., Hanninen, H., Akila, R., Kovala, T., Kuosma, E., Paakkulainen, H., Valkonen, S. and Engstrom, B., 2000. Body burden of aluminum in relation to central nervous system function among metal inert-gas welders. *Scand J Work Environ Health.* 26, 118-130.
- Rondeau, V., Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Helmer, C. and Dartigues, J. F., 2009. Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort. *Am J Epidemiol.* 169, 489-496.
- Torreilles, F. and Touchon, J., 2002. Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 66, 191-203.
- Walton, J. R., 2006. Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease. *Neurotoxicology.* 27, 385-394.

- Walton, J. R. and Wang, M. X., 2009. APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease. *J Inorg Biochem.* 103, 1548-1554.
- Watanabe, T., Yamagata, N., Takasaki, K., Sano, K., Hayakawa, K., Katsurabayashi, S., Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K. and Fujiwara, M., 2009. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1249, 222-228.
- West, M. J., Slomianka, L. and Gundersen, H. J., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231, 482-497.
- Wills, M. R. and Savory, J., 1989. Aluminum and chronic renal failure: sources, absorption, transport, and toxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 27, 59-107.
- Yu, Y., He, J., Zhang, Y., Luo, H., Zhu, S., Yang, Y., Zhao, T., Wu, J., Huang, Y., Kong, J., Tan, Q. and Li, X. M., 2009. Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus.* 19, 1247-1253.
- Yumoto, S., Kakimi, S., Ohsaki, A. and 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., Drago, D., Bolognin, S. and Sensi, S. L., 2009. Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 30, 346-355.
- Zatta, P., Ibn-Lkhatay-Idrissi, M., Zambenedetti, P., Kilyen, M. and Kiss, T., 2002. In vivo and in vitro effects of aluminum on the activity of mouse brain acetylcholinesterase. *Brain Res Bull.* 59, 41-45.
- Zhang, R. L., Zhang, Z. G. and Chopp, M., 2008. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* 55, 345-352.



Figure 1

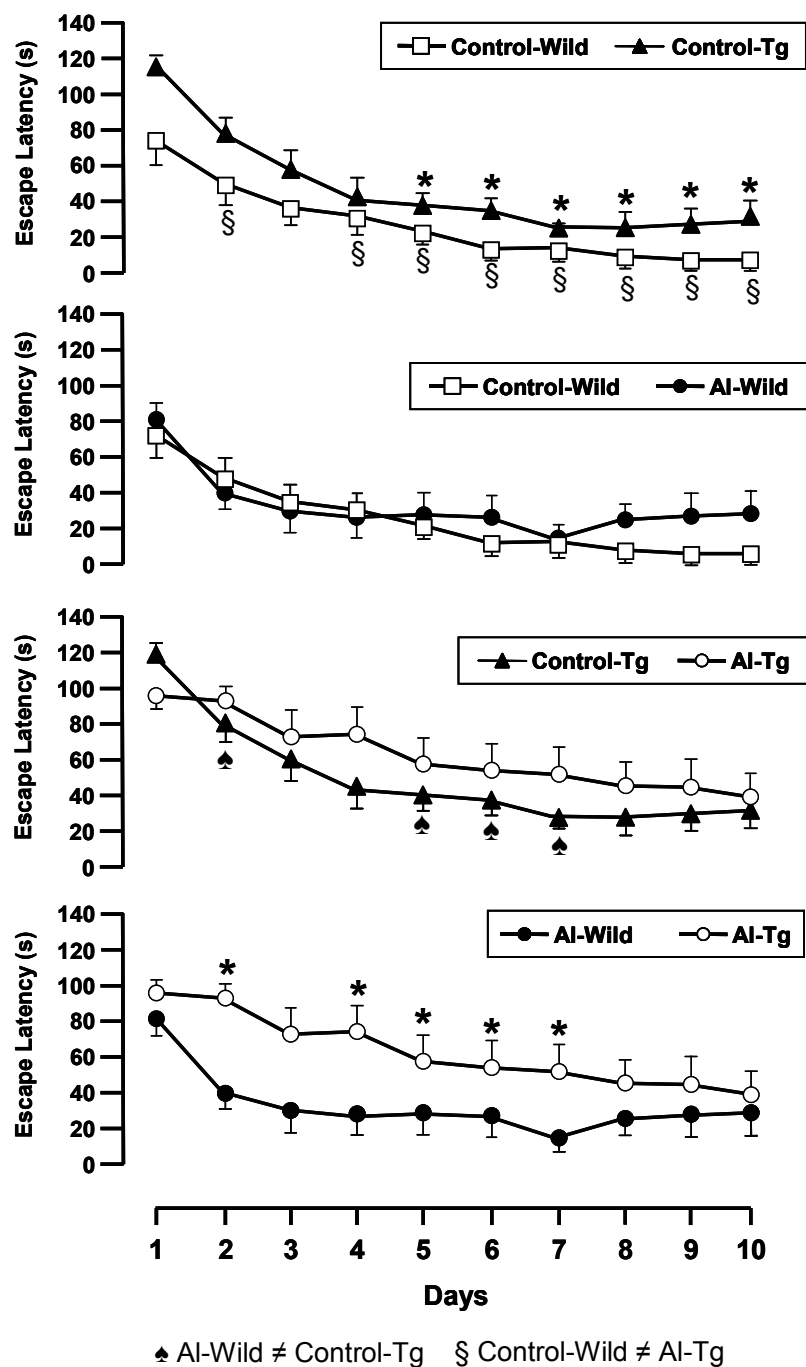


Figure 1. Mean escape latency ( $\pm$ SEM) over 10 acquisition days observed in the water maze. Kruskal-Wallis and the Mann-Whitney U-test were used for comparisons between groups. Pairs of groups are depicted for clarity. An asterisk indicates significant differences between pairs of groups, symbols §, ♣ indicate differences between groups from different pairs ( $p < 0.05$ ).

Figure 2

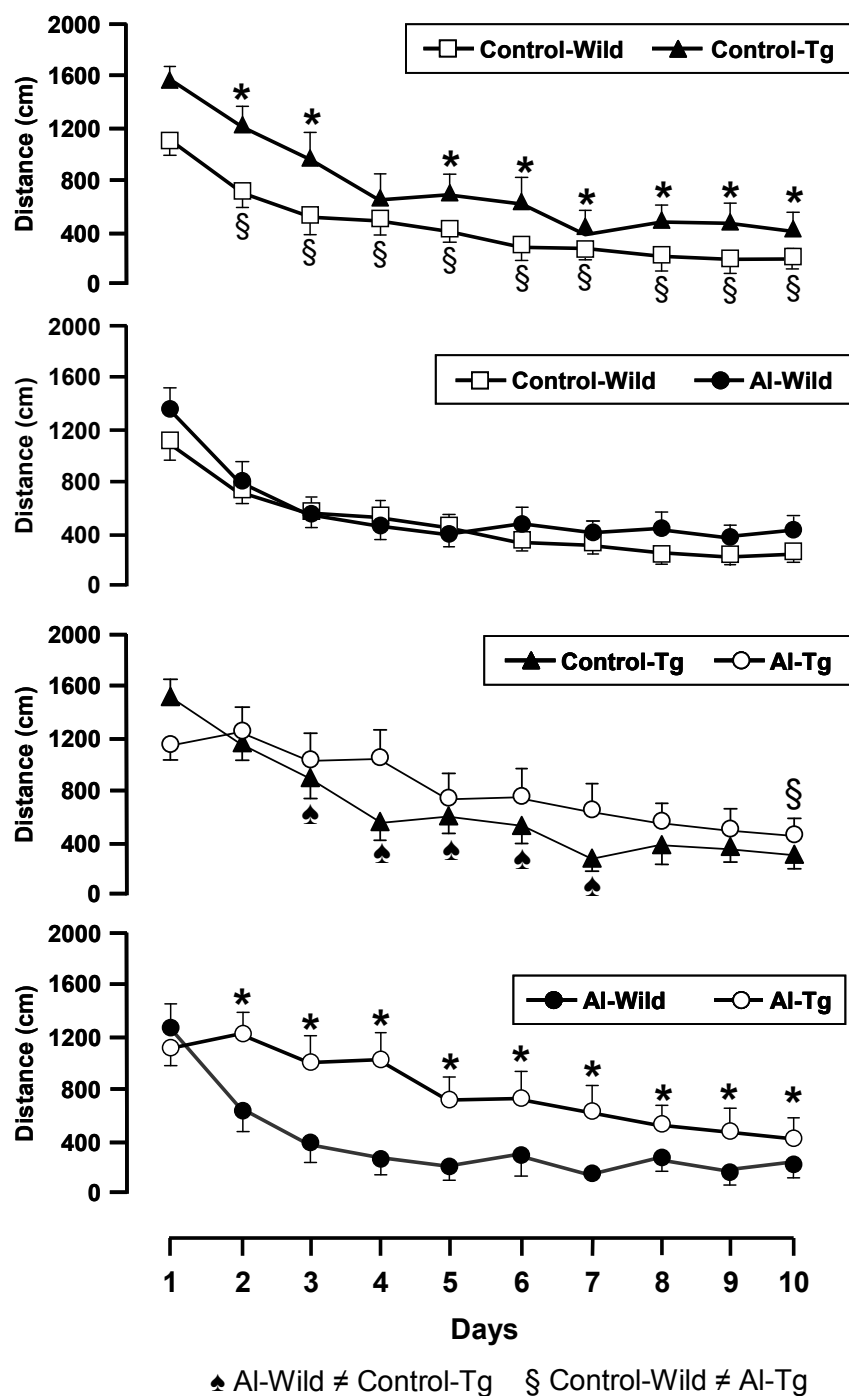


Figure 2. Mean distance traveled ( $\pm$ SEM) over 10 acquisition days observed in the water maze. Kruskal-Wallis and the Mann-Whitney U-test were used for comparisons between groups. Pairs of groups are depicted for clarity. An asterisk indicates significant differences between pairs of groups, symbols §, ♣ indicate differences between groups from different pairs ( $p < 0.05$ ).

Figure 3

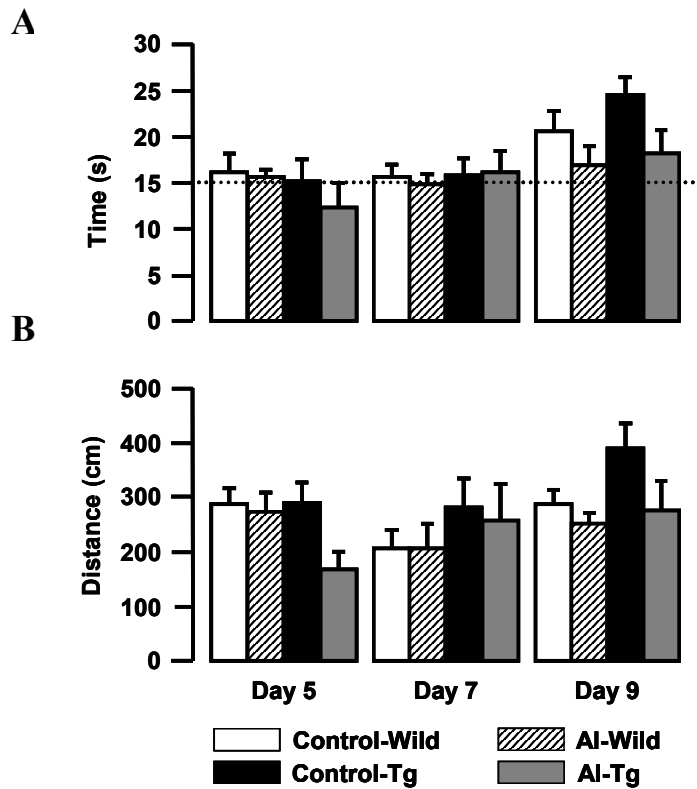


Figure 3. Probe trials carried out after training sessions on days 5,7 and 9. Time (**A**) and distance traveled (**B**) in the target quadrant. A discontinuous line indicates the random time in all quadrants. Data are given as mean  $\pm$  S.E.M.

Figure 4

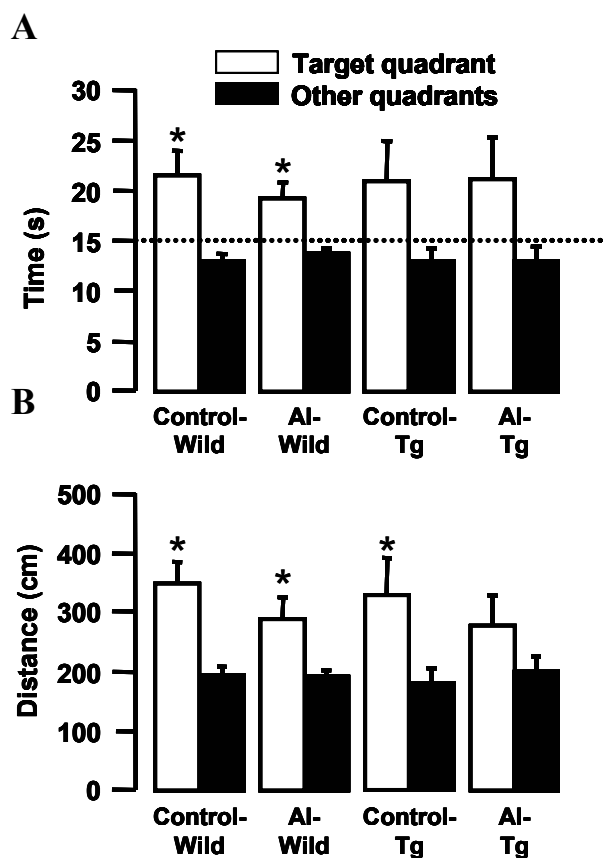
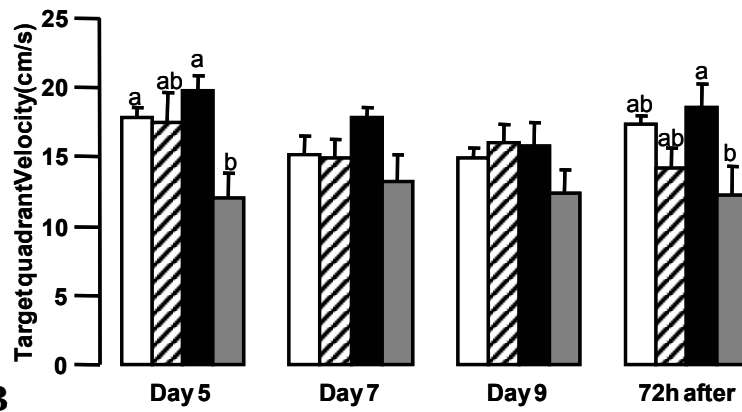


Figure 4. Probe trial carried out 72 h after the last training session. Time (A) and distance traveled (B) in the target quadrant with respect to other quadrants. A discontinuous line indicates the random time in all quadrants. Data are given as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant differences between the time spent or the distance moved in the target quadrant compared to the other quadrants ( $p < 0.05$ ).

Figure 5

A



B

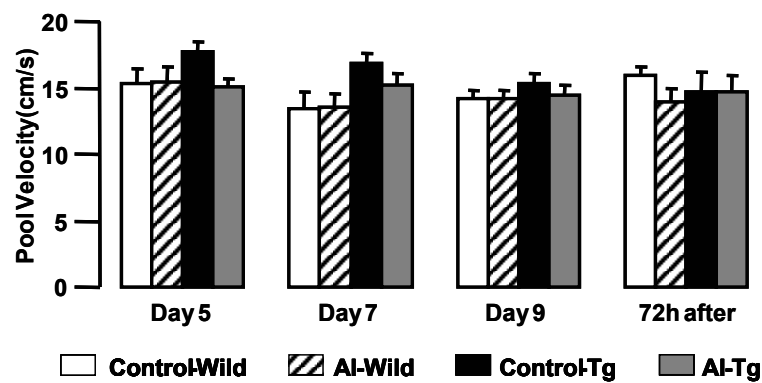


Figure 5. Swim velocity in the target quadrant (A) and in the pool (B) in the 4 different probes performed. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Different letters (a, b) indicates significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

Figure 6

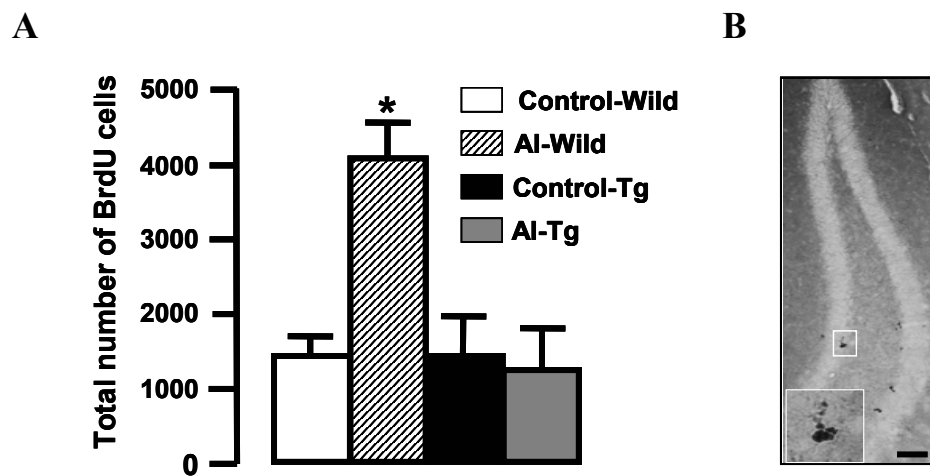


Figure 6. (A) Estimate total number of BrdU positive cells (proliferation) in the hippocampus, 24h after the last injection of BrdU. (B) Image shows immunoperoxidase staining for BrdU positive cells in hippocampus and a magnification of a neurogenic niche. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. An asterisk indicates significant differences from all the other groups. Scale bar indicates 25  $\mu$ m.

Figure 7

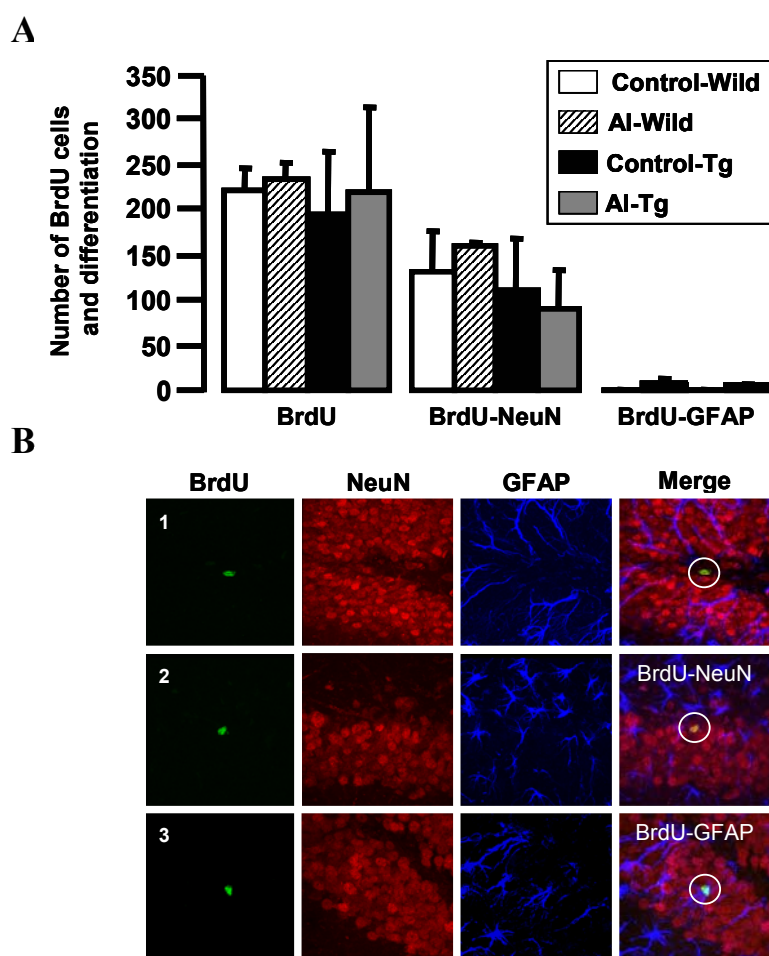


Figure 7. Survival and differentiation of new cells in hippocampus. (A) Indicates the estimated total number of BrdU positive cells, and the estimated total number of colocalization of BrdU-NeuN and BrdU-GFAP cells, 28 days after the last injection of BrdU. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.(B) Image shows (1) triple labeling staining and (2) colocalization of BrdU with NeuN and (3) colocalization of BrdU with GFAP.

Figure 8

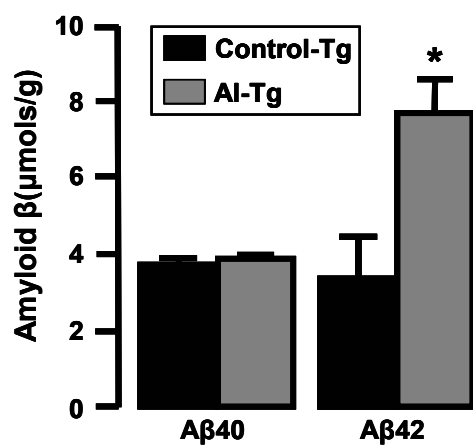


Figure 8. Amyloid  $\beta$  levels in brains of Tg2576 control mice or exposed to Aluminum lactate quantified by ELISA ( $n= 10-12$ ). An asterisk indicates significant differences between groups ( $p < 0.05$ ).

Figure 9

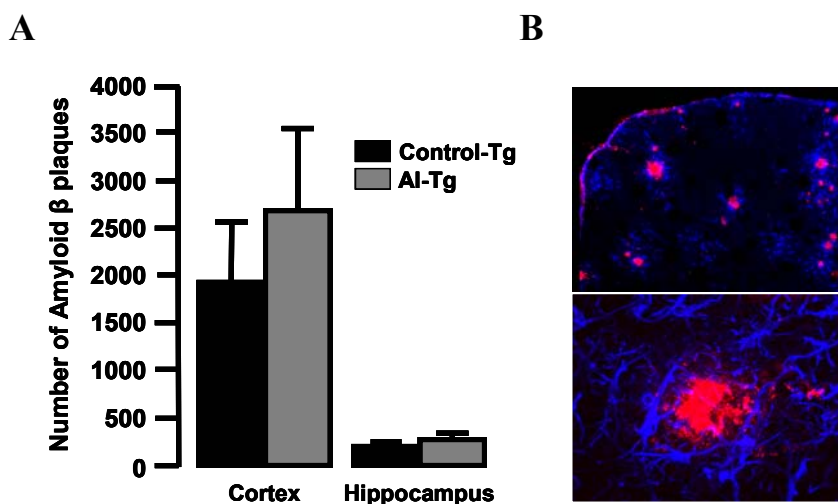


Figure 9. (A) Estimated number of amyloid  $\beta$  immunostained plaques in cortex and in hippocampus. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (B) Images show double immunostaining for amyloid  $\beta$  (red) and GFAP (blue), the distribution of amyloid  $\beta$  in cortex are shown in the top and a magnification showing an amyloid  $\beta$  plaque surrounded by GFAP positive cells (astrocytes) is shown in the bottom.





## ***V. DISCUSSIÓ***



L'alumini és l'element metàl·lic més abundant i constitueix al voltant del 8% de l'escorça terrestre. Per les seves propietats físico-químiques (lleuger, fort en l'aleació amb altres metalls, dúctil i mal·leable), és un element utilitzat en nombroses aplicacions industrials. La principal via d'exposició al metall per a la població general és el consum d'aliments, sobretot dels que contenen compostos d'alumini utilitzats com additius alimentaris. Malgrat l'elevada ingesta d'alumini, la seva absorció per part de l'organisme és baixa i varia en funció de diversos paràmetres com el tipus de sal d'Al administrat, el pH (que influeix en l'especiació i solubilitat de l'Al), i els diferents factors nutricionals que afecten la biodisponibilitat de l'Al. Sabem però, que és un potent neurotòxic i que en determinades situacions, com per exemple en els casos d'insuficiència renal en què l'eliminació està disminuïda, aquest element pot provocar trastorns com l'encefalopatia induïda per Al en subjectes dialitzats.

La finalitat d'aquest treball va ser avaluar els efectes de diferents dosis d'Al administrades per via oral, principal via d'exposició al metall en la població general, sobre la conducta i els processos de plasticitat neural en ratolins transgènics que presenten signes anatomopatològics i conductuals de malaltia d'Alzheimer. Amb aquest objectiu general, es van dissenyar tres fases experimentals diferents que avaluaven els efectes de 0, 1 o 11 mg de lactat d'Al/g de dieta després de 3, 6 i 9 mesos d'exposició, com hem presentat anteriorment.

Pel que fa a la conducta, varem valorar els efectes sobre l'activitat general, l'ansietat i els processos d'aprenentatge i memòria. Els efectes sobre l'activitat i l'ansietat van ser avaluats mitjançant el camp obert i la caixa de dos compartiments. Els resultats mostren que a mesura que s'incrementa l'edat dels animals la seva activitat disminueix. Aquest fet ha estat observat també per altres autors en la prova de camp obert en rosegadors i en animals Tg2576 (King i Arendash, 2002; Altun i col·ls., 2007). Pel que fa a l'ansietat els nostres resultats demostren que l'Al té efectes diferencials sobre aquest paràmetre depenent de la dosi i del temps d'exposició. De fet, quan la dosi de lactat d'Al administrada via oral és baixa (1 mg/g) i el període d'exposició és breu (3 mesos) no s'observen efectes en la prova del camp obert, però quan s'incrementa el temps d'exposició (6 mesos) i la dosi (11 mg/g) tant en la prova del camp obert com en la caixa de dos compartiments s'observen efectes ansiolítics del metall. El fet de que en un altre estudi on van administrar durant 3 mesos una dosi elevada

## *Discussió*

d'Al (50 mg/kg/dia) aquest presentés efectes ansiolítics fa pensar que és el factor temps d'exposició el que modificaria aquest efecte en l'ansietat (Rebai i Djebli, 2008). Tal vegada aquest efecte estigui relacionat amb el neurotransmissor GABA, ja que en un estudi van observar com l'administració oral d'alumini a dosis baixes (5 o 10 mg/kg/dia) durant dos mesos produïa increments en els nivells corticals del neurotransmissor GABA (Goncalves i Silva, 2007).

Les diferents fases experimentals realitzades en aquesta tesi doctoral, han avaluat també els efectes de l'alumini sobre els processos d'aprenentatge i memòria mitjançant diferents protocols d'adquisició de la tasca del laberint d'aigua de Morris, el que ens ha permès trobar resultats força interessants. Els rosegadors poden utilitzar diferents estratègies per resoldre la tasca del laberint d'aigua: d'orientació, de guia, cartogràfica i d'integració de la ruta (D'Hooge i De Deyn, 2001; Vicens i col·ls., 2003). Les diferents estratègies s'han relacionat amb diferents estructures cerebrals. La similitud entre les corbes d'aprenentatge dels grups exposats a dosis baixes d'Al durant 3 mesos i a dosis elevades durant 9 mesos unida als sorprenents resultats obtinguts en la segona condició experimental en la població de ratolins normal exposada a l'Al posa de manifest la importància del protocol utilitzat en cada condició. Així doncs, és interessant comparar els resultats obtinguts amb aquests dos protocols. Per una banda, la introducció d'una paret mòbil a l'interior del laberint en la primera i tercera fase experimental que suprimia els senyals proximals del laberint va forçar que els animals per trobar la plataforma utilitzessin una estratègia cartogràfica en la qual mitjançant claus visuals distals configuren una representació del seu entorn (mapa cognitiu) que els permet trobar la plataforma submergida. Per una altra banda, a la segona fase experimental aquesta paret mòbil va ser suprimida, per tant, els animals podien utilitzar una estratègia de guia en què aprenien associacions entre els estímuls senyal i la plataforma. En aquest sentit, quan es va eliminar la paret mòbil en la fase d'adquisició de la segona fase experimental (exposició 11 mg/g de lactat d'Al durant 6 mesos) possiblement es van emascarar els efectes de l'exposició a l'Al en la població de ratolins no susceptibles a desenvolupar l'AD. Es podria pensar que aquest fet està relacionat amb l'estructura cerebral implicada amb una i una altra estratègia utilitzada pels animals en funció del protocol. Si els animals utilitzen una estratègia de tipus guia, és possible que l'estructura cerebral involucrada en aquest tipus d'aprenentatge sigui l'escorça parietal, implicada en el

processament dels senyals pròxims (Save i Poucet, 2000; Rogers i Kesner, 2006), mentre que quan utilitzen una estratègia cartogràfica, l'estructura implicada és l'hipocamp (Vicens i col·ls, 2003). D'aquesta manera, es podria pensar que l'Al, tot i estar afectant a l'hipocamp, no seria capaç d'alterar el funcionament de l'escorça parietal en el grup de ratolins *wild* per la qual cosa no s'observa deteriorament en aquest grup. A més a més, els resultats observats en els assajos de prova indiquen que la utilització d'aquesta estratègia no afavoriria el record de la ubicació de la plataforma. Hem de tenir en compte però, que les estructures cerebrals encarregades de processar la informació en tasques d'orientació espacial poden activar-se de manera simultània (Rogers i Kesner, 2007).

És un fet reconegut que l'execució en el laberint aquàtic empitjora a mesura que s'incrementa l'edat dels animals (Sharma i col·ls., 2010). Tanmateix, aquest fet però no s'observa en els nostres estudis. A l'última condició experimental en la qual els animals tenen aproximadament 6 mesos més que en la primera fase tots els grups experimentals mostren latències al final del període d'adquisició molt similars o fins i tot millors que les registrades a la primera condició experimental. Aquest fet pot ser explicat pel canvi en el protocol; allargant el període d'adquisició, disminuint el número d'assajos per sessió a dos i incrementant l'interval entre assajos. La distribució d'assajos al llarg del temps pot ser més efectiva perquè l'activació de cèl·lules durant un període de temps més llarg permet canvis en l'expressió gènica i promou canvis en la inducció i l'expressió de la síntesi de proteïnes (Sisti i col·ls., 2007). A més, s'ha trobat que l'estimulació tetànica espaiada induïx una expressió més persistent de la potenciació a llarg termini (Scharf i col·ls., 2002). En un altre estudi van observar com rates de 3 mesos d'edat entrenades en el laberint aquàtic de Morris utilitzant assajos d'adquisició espaiats (4 assajos/dia durant 4 dies) mostraven millors corbes d'aprenentatge i un millor record d'on estava ubicada la plataforma que les rates entrenades amb assajos d'adquisició massificats (16 assajos/1 dia) (Commins i col·ls., 2003).

En general, en tots els assajos de prova realitzats per avaluar la memòria espacial dels animals, els grups exposats a l'Al presenten un deteriorament de la mateixa quan es compara el temps en el quadrant on estava ubicada la plataforma durant els assajos d'adquisició de la tasca en comparació amb la mitjana del temps passat en els altres tres quadrants. Aquestes dades demostren clarament efectes deleteris de l'Al en els processos de memòria. En aquest

## Discussió

sentit, en un article recent realitzat en rates exposades oralment a clorur d'Al durant tres mesos es va observar com l'acumulació d'Al a l'hipocamp disminuïa l'activitat de diverses kinases involucrades en la inducció i formació de la potenciació a llarg termini, afectant la memòria de les mateixes (Wang i col·ls., 2010).

Respecte a la neurogènesi, l'exposició a l'Al va produir efectes en la proliferació cel·lular tant si l'exposició a l'Al era a dosis baixes i durant tres mesos com quan la dosi era elevada i el temps d'exposició llarg (9 mesos). Aquesta influència, però, es manifesta en sentit diferent en les dues fases experimentals. L'exposició breu (3 mesos) a una dosi baixa de lactat d'Al (1 mg/g) en animals de 8 mesos d'edat incrementa la proliferació cel·lular en el grup de ratolins model d'AD (Tg2576). Per contra, en els animals de 14 mesos d'edat exposats de manera perllongada a una dosi alta de lactat d'Al (11 mg/g) la major proliferació s'observa en el grup d'animals *wild*. Tal vegada l'explicació a aquests resultats ens porti a comprendre la proliferació en el gir dentat de l'hipocamp com un mecanisme compensatori que intenta mitigar els efectes nocius de l'Al. En aquest sentit, alguns autors proposen que els processos de neurogènesi són induïts per l'organisme davant de l'afectació cerebral que es produeix en les fases inicials de la neurodegeneració (Ming i Song, 2005; Klempin i Kempermann, 2007; Thompson i col·ls., 2008). En els animals genèticament vulnerables per desenvolupar l'AD l'exposició breu a l'Al engega abans aquest mecanisme mentre que en la població no vulnerable genèticament aquest es posa en marxa quan els animals tenen més edat, després de l'exposició perllongada a dosis elevades del metall. És com si engegar aquest mecanisme compensatori depengués de la vulnerabilitat genètica dels animals (la mutació de l'APP) o dels danys produïts per l'exposició al metall, de manera que quan els danys s'agreugen ja no fóra capaç d'activar-se (recordem que a l'última fase experimental el grup de transgènics exposats són els que menys proliferació presenten). De fet, la neurogènesi registrada en models animals de malaltia d'Alzheimer amb mutacions en la proteïna precursora de l'amiloide és un paràmetre altament variable, ja que va des d'estudis on troben un increment de la neurogènesi en aquests models (Jin i col·ls., 2004a; Yu i col·ls., 2009) fins a d'altres que troben una relació negativa entre els dos factors (Haughey i col·ls., 2002; Donovan i col·ls., 2006; Zhang i col·ls., 2007; Ermini i col·ls., 2008). En concret, respecte al model animal Tg2576, un estudi fet fins al moment per avaluar l'efecte de l'aïllament sobre la proliferació cel·lular i la deposició de plaques d'A $\beta$  en ratolins transgènics de 3, 6 i 9 mesos d'edat

assenyala un descens de la proliferació cel·lular en el gir dentat de l'hipocamp independentment de la deposició de plaques de beta amiloide, ja que aquest decrement s'observa en totes les edats estudiades (Dong i col·ls., 2004).

Des que a l'any 2001 Shors i col·laboradors van comprovar que la neurogènesi a l'hipocamp està involucrada en processos d'aprenentatge i memòria molts més treballs han aprofundit en aquesta relació. En un d'ells es va trobar una correlació positiva entre la neurogènesi i l'execució en el laberint aquàtic de Morris en rates de 20 mesos d'edat (Drapeau i col·ls., 2003). Altres estudis més recents, reconeixen el paper necessari de la neurogènesi en formes complexes d'aprenentatge i memòria hipocamp-depenent (Dupret i col·ls., 2008). No podem obviar però, que els resultats obtinguts en diferents estudis sobre els processos de neurogènesi en models animals d'AD han de ser extrapolats als humans amb molta cautela per diverses raons. La primera és la divergència de resultats entre estudis, segurament a conseqüència de les diferents mutacions dels ratolins estudiats. En segon lloc, mentre que els models animals estan basats en l'expressió transgènica de gens humans portadors de mutacions responsables de l'AD familiar, la majoria de casos d'AD en humans no són de tipus familiar. Per últim, els models transgènics no representen completament les característiques observades en l'AD; per exemple, els ratolins Tg2576 que expressen una mutació en l'APP humana no desenvolupen cabdells neurofibrilars, que estan presents en els pacients amb AD (Greenberg i col·ls., 2007).

Encara que no fos l'objectiu principal d'aquesta tesi avaluar l'efecte de l'aprenentatge en la neurogènesi, els diferents resultats trobats en neurogènesi poden vincular-se, encara que de manera especulativa, amb els canvis de protocol en la tasca d'aprenentatge i memòria espacial realitzats al llarg de les fases experimentals. El fet que quantitativament les dades en la proliferació, supervivència i diferenciació a neurona madura són estables, especialment en el grup de ratolins no modificats genèticament, en la tercera fase experimental en la qual els animals són més vells, respecte a les altres dos fases ens fa pensar que tal vegada l'aprenentatge espaiat en el temps, amb un interval entre assajos més elevat sigui el causant de que les xifres es mantinguin. En aquest sentit, en un estudi relativament recent es va observar que rates de 20 mesos d'edat amb la memòria espacial preservada mostraven un major nombre de proliferació cel·lular i de cèl·lules diferenciades a neurona en comparació



## Discussió

amb rates amb la memòria espacial afectada avaluada aquesta amb el laberint aquàtic de Morris (Drapeau i col·ls., 2003). A més a més, rates joves entrenades en el laberint aquàtic de Morris utilitzant un protocol d'adquisició al llarg del temps (4 assajos/dia durant 4 dies) mostaven un augment de la memòria així com un increment en el número de cèl·lules que sobreviuen en comparació amb les rates entrenades de manera massiva (16 assajos en 1 dia) (Sisti i col·ls., 2007). En un treball recent, Tronel i col·laboradors (2010) apuntaven que l'aprenentatge espacial incrementa la complexitat de l'arbre dendrític i accelera la diferenciació de les noves cèl·lules cap a un fenotip de neurona madura. Tanmateix, en la segona fase experimental de la present tesi doctoral, malgrat que es registra un número elevat de cèl·lules que sobreviuen la quantitat de diferenciació a neurona madura és baixa en els dos grups de ratolins *wild*. Aquest fet ens fa pensar que gran part de les cèl·lules que en aquell moment havien sobreviscut i continuaven sense diferenciar-se van acabar morint en major proporció de la que es registra en condicions normals, que s'estima en aproximadament el 50% (Winner i col·ls., 2002; Kempermann i col·ls., 2003).

Contràriament al fet reconegut de que quantitativament la neurogènesi va disminuint a mesura que l'edat dels animals s'incrementa (Kuhn i col·ls., 1996; Galvan i Jin, 2007; Klempin i Kempermann, 2007), en els nostres estudis no es demostra aquest efecte. Cal però tenir en compte que en els nostres estudis el rang d'edats estudiades és de 8 a 15 mesos, mentre que altres autors han treballat amb edats menys avançades. L'augment de la proliferació en tots els grups (excepte en el transgènic exposat) en la tercera fase respecte a la primera i segona condició experimental apunta a la importància del protocol utilitzat per realitzar la tasca d'aprenentatge i memòria del laberint aquàtic. La utilització d'una tasca hipocamp-depenent, la reducció dels assajos en cada sessió, així com l'augment dels dies d'adquisició i del temps entre assajos juntament amb un augment en l'activitat física podrien ser factors que contribuïssin a l'increment de la proliferació cel·lular. Tenint en compte l'estudi de Schmidt-Hieber (2004) en el qual es mostra com les neurones neofornades presenten un llindar més baix per a la inducció de la potenciació a llarg termini (LTP), la proliferació cel·lular observada en el nostre estudi podria estar propiciant aquesta LTP a l'hipocamp. Aquesta potenciació influiria en la ratio de producció i supervivència de les noves cèl·lules granulars nascudes ja que, com han demostrat altres autors, l'aprenentatge espacial incrementa la complexitat de l'arbre dendrític i accelera la diferenciació de les noves cèl·lules cap a un fenotip de neurona

madura (Tronel i col·ls., 2010). Tot i que l'augment en la proliferació cel·lular observat a la tercera fase experimental podria estar relacionat amb els bons resultats observats en la tasca d'aprenentatge (en el cas que aquestes neurones sobrevisquessin i s'integressin en els circuits funcionals relacionats amb l'aprenentatge,) malauradament, el protocol utilitzat no ens permet comprovar si això ha estat així.

La baixa diferenciació registrada al llarg de les fases experimentals a cèl·lules gials és semblant a l'observada en altres treballs on s'avalua la diferenciació cel·lular (Kempermann i Gage, 2002; Ermini i col·ls., 2008). En un estudi realitzat per Steiner i col·laboradors (2004) van comprovar com 4 setmanes després de la injecció de BrdU el número de cèl·lules BrdU positives que es diferenciaven en GFAP era molt baix. Aquests mateixos autors, indiquen que una fracció de cèl·lules GFAP positives expressen nestina (marcador que reconeix a la proteïna tipus IV dels filaments intermijos, expressada en les cèl·lules troncales del neuroepiteli primitiu), i suggeririen que aquestes cèl·lules poden constituir un reservori de cèl·lules indiferenciades que actuarien com a precursors neurals. A més a més, afirmen que l'astrogènesi es produeix paral·lelament i en algun grau independentment de la neurogènesi en adults (Wei i col·ls., 2002; Filippov i col·ls., 2003; Steiner i col·ls., 2004). El fet de que en l'última condició experimental els únics grups que presentaren diferenciació a astròcits foren els exposats, corrobora els resultats obtinguts tant en estudis de cultiu cel·lular com en estudis amb animals en els quals s'observa la síntesi de GFAP com a conseqüència de l'exposició al metall (Yokel i O'Callaghan, 1998; Toimela, 2004). En aquest cas no pensem que aquesta diferenciació a cèl·lules gials en els grups exposats estigui relacionada amb cèl·lules immadures que passin a ser un reservori per a posteriors divisions, sinó que aquest augment en l'expressió de la GFAP estaria associada amb la gliosis, una resposta inespecífica del sistema nerviós central davant de dany neuronal. Tot i així, caldria corroborar aquesta suposició.

Pel que fa als efectes de l'Al sobre els nivells de proteïna amiloide i l'acumulació de plaques d'aquesta proteïna, vam observar que l'exposició a dosis baixes de lactat d'Al (1 mg/g) administrat durant un curt període de temps (3 mesos) augmenta els nivells d'A $\beta$  tipus 1-40 i 1-42 en els grups de ratolins transgènics, però l'exposició a l'Al no afecta aquest paràmetre. A més a més, quan s'utilitzen dosis més elevades (11 mg/g) i un període

### *Discussió*

d'exposició més llarg (6 mesos), trobem aquest mateix increment així com un augment de les plaques a l'escorça cerebral en comparació amb l'hipocamp. Els nivells de beta estarien augmentats en el grup de transgènics tractats en la forma 1-40 a l'escorça, mentre que en la forma 1-40 a l'hipocamp i en l'1-42 tant a l'escorça com a l'hipocamp és el grup transgènic control el que mostra majors nivells. En aquest cas, com en la primera condició els nivells d'A $\beta$  no s'eleven per l'exposició a l'Al.

La forma 1-40 comprèn aproximadament el 90% de tota l'A $\beta$  alliberada des de les cèl·lules i sembla contribuir només en les fases més avançades de la patologia. La forma 1-42 comprèn aproximadament el 10% de l'A $\beta$  secretada, i és el pèptid que es troba principalment en les plaques amiloides de l'AD. El pèptid A $\beta$  1-42 s'agrega i es polimeritza en fibrilles d'amiloide més fàcilment que l'A $\beta$  1-40 i es pensa que és precisament aquesta propietat la que li confereix la major toxicitat al pèptid (Verdile i col·ls., 2004). Tot i això, el número de cabdells neurofibrilars és un índex que correlaciona millor amb els dèficits cognitius presents en els casos de malaltia d'Alzheimer que no pas el número de plaques d'amiloide (Turner i col·ls., 2003). Plantejar un estudi que consti de diverses fases experimentals aporta l'avantatge d'observar com van canviant els paràmetres estudiats a mesura que s'incrementa el temps d'exposició i l'edat dels animals. En aquest cas, respecte als nivells de proteïna A $\beta$  1-40 i 1-42 va ser en la condició en que l'exposició era perllongada (9 mesos) i la dosi elevada (11 mg/g) en la que els nivells d'A $\beta$  de tipus 1-42 es van trobar més elevats que els de l'1-40 en la població de ratolins susceptibles genèticament per desenvolupar l'AD.

Els resultats en aquest camp són controvertits. Existeixen estudis que troben alteracions de la proteïna precursora d'amiloide després de l'exposició a l'Al tant en animals (Walton i Wang, 2009) com en cultius cel·lulars (Kuroda i Kawahara, 1994; Drago i col·ls., 2007). En un estudi realitzat per Praticò i col·laboradors (2002) en ratolins Tg2576 exposats per via oral a Al durant 6 mesos, van observar resultats similars en quant a l'augment del pèptid A $\beta$  1-40 tant en còrtex com en hipocamp als 12 mesos d'edat. El factor determinant que explicaria les diferències entre els resultats trobats entre aquest estudi i el nostre en quant als efectes de l'Al en la quantitat dels nivells de la proteïna A $\beta$  1-42 apunten a la dosi de l'Al amb la qual el pinso era suplementat i que no va ser descrita en aquest estudi. En un estudi recent fet en cultius hipocampals de rata per avaluar els efectes del quinat d'Al en els

nivells de beta amiloide no es va observar cap relació entre els dos factors (Nday i col·ls., 2010).

Tenint en compte totes les fases experimentals, l'augment del pèptid A $\beta$  1-42 en la tercera fase experimental en els animals Tg2576 exposats a Al podria estar relacionat amb la corba d'aprenentatge més lenta mostrada per aquest grup respecte al seu control, malgrat que no existeixen diferències significatives entre ells. La proteïna  $\beta$ -amiloide pot afectar la inducció i la consolidació dels processos de potenciació a llarg termini (Chen i col·ls., 2000; 2002). De fet, en un estudi realitzat per Chapman i col·laboradors (1999) en van observar danys en la potenciació a llarg termini en ratolins vells amb la mutació Swedish. Aquest efecte pot incrementar-se per l'exposició a l'Alumini (Wang i col·ls., 2010). Curiosament també és aquest grup el que menys nombre de noves cèl·lules nascudes presenta 24 hores després de l'última injecció de BrdU, així com de cèl·lules diferenciades a neurona madura. És un fet reconegut que les noves neurones nascudes en adults expressen propietats que contribueixen a la potenciació a llarg termini en el gir dentat (Wang i col·ls., 2000; Schmidt-Hieber i col·ls., 2004; Saxe i col·ls., 2006), aquest és un mecanisme sinàptic en el qual es sustenta l'aprenentatge i la memòria (Martin i Morris, 2002). A més, la potenciació a llarg termini influeix en la producció i la supervivència de noves neurones granulars (Bruehl-Jungerman i col·ls., 2006).

El contingut d'Al en el cervell s'incrementa entre el naixement i la vellesa, inclòs en humans no demenciats, i la seva distribució al mateix no és uniforme. En pacients amb diagnòstic de malaltia d'Alzheimer s'ha observat presència d'Al en les neurones hipocampals (Walton, 2006) així com en les plaques senils (Yumoto i col·ls., 2009). La quantificació de l'Al en mostres biològiques és complexa degut a la ubiqüitat del metall. En aquest sentit els resultats trobats en les diferents fases experimentals realitzades en el present treball mostren un augment del metall en tots els grups experimentals a mesura que l'edat dels animals s'incrementa. El fet de que l'augment del metall es produeixi en tots els grups quan els animals tenen 11 mesos d'edat i de que aquest increment sigui substancial respecte a la primera condició experimental fa pensar que l'acumulació del metall és un paràmetre temps-depenent. De fet s'ha observat com l'Al s'acumula en cervells humans amb l'edat, sent un paràmetre temps-depenent (Golub i col·ls., 2000).

### *Discussió*

Tot i que no podem oblidar que la majoria de casos diagnosticats d'AD són de tipus esporàdic i que la utilització d'un model animal de malaltia d'Alzheimer de tipus familiar no presenta totes les característiques patològiques observades a l'AD, els resultats obtinguts en la present tesi doctoral són una petita peça del complex trencaclosques que suposa una malaltia neurodegenerativa com la malaltia d'Alzheimer i representen un pas endavant en l'estudi i la comprensió de la interrelació entre els factors genètics i ambientals en la etiologia d'aquest tipus de demència cada cop més freqüent a la nostra societat.

## ***VI. CONCLUSIONS***



1. L'administració oral a una dosi d'1 mg/g de dieta de lactat d'Alumini durant 3 mesos no produeix efectes a nivell conductual en la població de ratolins Tg2576 ni en els seus respectius controls.
2. L'administració oral a una dosi d'11 mg/g de dieta de lactat d'Alumini durant 6 mesos genera efectes ansiolítics en el test del camp obert i en la caixa de dos compartiments.
3. La utilització dels diferents protocols emprats en el laberint aquàtic ha permès evidenciar els efectes en l'aprenentatge tant de les dosis baixes i altes de lactat d'Al, administrat després de 3, 6 i 9 mesos, tant en població normal com en el grup de ratolins Tg2576 quan les tasques utilitzades eren complexes.
4. Els ratolins Tg2576 de 8, 11 i 14 mesos d'edat presenten en totes les condicions d'aprenentatge aplicades corbes d'aprenentatge pitjors que els animals *wild*.
5. La proliferació, la supervivència i la diferenciació cel·lular a neurona madura es mantenen estables encara que s'incrementi l'edat dels animals.
6. L'exposició tant a dosis baixes com elevades d'Al produeix efectes en la fase de proliferació cel·lular. S'observa un increment en la proliferació cel·lular en el grup de ratolins Tg2576 exposat durant tres mesos a dosis baixes de lactat d'Al (1 mg/g de dieta) així com en el grup de ratolins *wild* quan l'exposició és prolongada i a elevades dosis de lactat d'Al (11 mg/g de dieta).
7. Encara que els nivells de pèptid beta amiloide tant de tipus 1-40 com 1-42 es van incrementar a mesura que l'edat dels animals Tg2576 augmentava, va ser necessària l'exposició a dosis elevades i prolongades de lactat d'Al (11 mg/g de dieta) per observar un augment del pèptid més amiloidogènic, és a dir, de l'1-42.





## ***VII. BIBLIOGRAFIA***



- Abbate, C., Giorgianni, C., Brecciaroli, R., Tringali, M. A. i D'Arrigo, G. (2003) "Spirometric function in non-smoking workers exposed to aluminum". *Am J Ind Med* 44, 400-404.
- Abrous, D. N., Koehl, M. i Le Moal, M. (2005) "Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology". *Physiol Rev* 85, 523-569.
- Alfrey, A. C., Mishell, J. M., Burks, J., Contiguglia, S. R., Rudolph, H., Lewin, E. i Holmes, J. H. (1972) "Syndrome of dyspraxia and multifocal seizures associated with chronic hemodialysis". *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 18, 257-261, 266-257.
- Altman, J. (1969) "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb". *J Comp Neurol* 137, 433-457.
- Altman, J. i Das, G. D. (1965) "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats". *J Comp Neurol* 124, 319-335.
- Altman, J. i Das, G. D. (1966) "Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions". *J Comp Neurol* 126, 337-389.
- Altun, M., Bergman, E., Edstrom, E., Johnson, H. i Ulfhake, B. (2007) "Behavioral impairments of the aging rat". *Physiol Behav* 92, 911-923.
- Alvarez-Buylla, A. i Lim, D. A. (2004) "For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain". *Neuron* 41, 683-686.
- Allen, E. (1912) "The cessation of mitosis in the central nervous system of albino rat". *J. Comp. Neurol.* 19, 547-568.
- Allwood, M. C., Sizer, T., Driscoll, D. F., Ball, P. A. i (1999) "Aluminium in parenteral nutrition admixtures: an unnecessary risk?" *Nutrition* 15, 958-959.
- Anstey, K. J., Mack, H. A. i Cherbuin, N. (2009) "Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies". *Am J Geriatr Psychiatry* 17, 542-555.
- Arias-Carrión, O., Olivares-Bañuelos, T. i Drucker-Colín, R. (2007) "Neurogénesis en el cerebro adulto". *REV NEUROL* 44, 541-550.

## *Bibliografia*

- Arvanitakis, Z., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Evans, D. A. i Bennett, D. A. (2004) "Diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease and decline in cognitive function". *Arch Neurol* 61, 661-666.
- ATSDR. (2006) "Toxicological profile for aluminum". Agency for toxic substances and disease registry. Atlanta: Department of Health and Human services, Public Health Service.
- ATSDR. (2008) "Toxicological profile for aluminum". Agency for toxic substances and disease registry. Atlanta: Department of Health and Human services, Public Health Service.
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H. i Feldon, J. (2004) "Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety". *Neurosci Biobehav Rev* 28, 273-283.
- Barnea, A. i Nottebohm, F. (1994) "Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees". *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11217-11221.
- Bast-Pettersen, R., Skaug, V., Ellingsen, D. i Thomassen, Y. (2000) "Neurobehavioral performance in aluminum welders". *Am J Ind Med* 37, 184-192.
- Bataineh, H., Al-Hamood, M. H. i Elbetieha, A. M. (1998) "Assessment of aggression, sexual behavior and fertility in adult male rat following long-term ingestion of four industrial metals salts". *Hum Exp Toxicol* 17, 570-576.
- Baum, L. W. (2005) "Sex, hormones, and Alzheimer's disease". *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60, 736-743.
- Beauchemin, D. i Kisilevsky, R. (1998) "A method based on ICP-MS for the analysis of Alzheimer's amyloid plaques". *Anal Chem* 70, 1026-1029.
- Bendlin, B. B., Carlsson, C. M., Gleason, C. E., Johnson, S. C., Sodhi, A., Gallagher, C. L., Puglielli, L., Engelman, C. D., Ries, M. L., Xu, G., Wharton, W. i Asthana, S. (2010) "Midlife predictors of Alzheimer's disease". *Maturitas* 65, 131-137.
- Berciano, J. (2006) "Enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Demencias. Enfermedad de Alzheimer". Farreras P, Rozman C. *Medicina Interna*. 15<sup>a</sup> edición. Madrid, España: Editorial Elsevier 2, 1486-1489.
- Bizon, J. L. i Gallagher, M. (2005) "More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in Long-Evans rats". *Sci Aging Knowledge Environ*, re2.
- Blennow, K., de Leon, M.J. i Zetterberg, H. (2006) "Alzheimer's disease" *Lancet* 368, 387-403.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C. i Laroche, S. (2006) "Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus". *J Neurosci* 26, 5888-5893.

- Burge, P. S., Scott, J. A. i McCoach, J. (2000) "Occupational asthma caused by aluminum". *Allergy* 55, 779-780.
- Cacabelos, R. (2001) "Enfermedad de Alzheimer: Presente terapéutico y retos futuros". *Rev Colom Psiquia* 3, 215-238.
- Cain, D. P. i Saucier, D. (1996) "The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances". *Rev Neurosci* 7, 215-231.
- Cameron, H. A. i McKay, R. D. (2001) "Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus". *J Comp Neurol* 435, 406-417.
- Carro, E. i Torres-Aleman, I. (2004) "The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease". *Eur J Pharmacol* 490, 127-133.
- Collingwood, J. F., Chong, R. K., Kasama, T., Cervera-Gontard, L., Dunin-Borkowski, R. E., Perry, G., Posfai, M., Siedlak, S. L., Simpson, E. T., Smith, M. A. i Dobson, J. (2008) "Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material". *J Alzheimers Dis* 14, 235-245.
- Commins, S., Cunningham, L., Harvey, D. i Walsh, D. (2003) "Massed but not spaced training impairs spatial memory". *Behav Brain Res* 139, 215-223.
- Craft, S. (2007) "Insulin resistance and Alzheimer's disease pathogenesis: potential mechanisms and implications for treatment". *Curr Alzheimer Res* 4, 147-152.
- Crapper, D. R., Krishnan, S. S. i Dalton, A. J. (1973) "Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration". *Science* 180, 511-513.
- Cressant, A., Muller, R. U. i Poucet, B. (1997) "Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells". *J Neurosci* 17, 2531-2542.
- Crouch, P. J., Harding, S. M., White, A. R., Camakaris, J., Bush, A. I. i Masters, C. L. (2008) "Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease". *Int J Biochem Cell Biol* 40, 181-198.
- Chang, D., Kwan, J. i Timiras, P. S. (1997) "Estrogens influence growth, maturation, and amyloid beta-peptide production in neuroblastoma cells and in a beta-APP transfected kidney 293 cell line". *Adv Exp Med Biol* 429, 261-271.
- Chapman, P. F., White, G. L., Jones, M. W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V. J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M. A., Bliss, T. V., Hyman, B. T., Younkin, S. G. i Hsiao, K. K. (1999)

## *Bibliografia*

- "Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice". *Nat Neurosci* 2, 271-276.
- Chapman, P. F., Falinska, A.M., Knevet, S.G. i Ramsay, M.F. (2001) "Genes, models and Alzheimer's disease" *Trends in Gen* 17, 254-261.
- Chen, Q. S., Kagan, B. L., Hirakura, Y. i Xie, C. W. (2000) "Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides". *J Neurosci Res* 60, 65-72.
- Chen, Q. S., Wei, W. Z., Shimahara, T. i Xie, C. W. (2002) "Alzheimer amyloid beta-peptide inhibits the late phase of long-term potentiation through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus". *Neurobiol Learn Mem* 77, 354-371.
- Colomina, M. T., Roig, J. L., Sánchez, D. J. i Domingo J. L. (2002) "Influence of age on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in rat brain". *NeuroTox* 23, 775-781.
- D'Hooge, R. i De Deyn, P. P. (2001) "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory". *Brain Res Brain Res Rev* 36, 60-90.
- Dinman, B. D. (2001) "Aluminium". In: Bingham E, Cohn B, Powell C, editors. *Patty's toxicology*. New York: John Wiley, 353-415.
- Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C. A., Bertchume, A. i Csernansky, J. G. (2004) "Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress". *Neuroscience* 127, 601-609.
- Donovan, M. H., Yazdani, U., Norris, R. D., Games, D., German, D. C. i Eisch, A. J. (2006) "Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease". *J Comp Neurol* 495, 70-83.
- Drago, D., Folin, M., Baiguera, S., Tognon, G., Ricchelli, F. i Zatta, P. (2007) "Comparative effects of Abeta(1-42)-Al complex from rat and human amyloid on rat endothelial cell cultures". *J Alzheimers Dis* 11, 33-44.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V. i Abrous, D. N. (2003) "Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14385-14390.
- Driscoll, C. T. i Letterman, R. D. (1995) "Factors regulating residual aluminium concentrations in treated waters". *Environmetrics* 6, 287-309.

- Duff, K. i Suleman, F. (2004) "Transgenic mouse models of Alzheimer'How useful have they been for therapeutic development?". *Briefings functional genomics and proteomics* 3, 47-59.
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N. i Piazza, P. V. (2008) "Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis". *PLoS One* 3, e1959.
- Elder, G., Gama Sosa, M. A. i Gaspari, R. (2010) "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease". *Mount Sinai Journal of Medicine* 77, 69-81.
- Encinas, J. M. i Enikolopov, G. (2008) "Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain". *Methods Cell Biol* 85, 243-272.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. i Gage, F. H. (1998) "Neurogenesis in the adult human hippocampus". *Nat Med* 4, 1313-1317.
- Ermini, F. V., Grathwohl, S., Radde, R., Yamaguchi, M., Staufenbiel, M., Palmer, T. D. i Jucker, M. (2008) "Neurogenesis and alterations of neural stem cells in mouse models of cerebral amyloidosis". *Am J Pathol* 172, 1520-1528.
- Exley, C. (1996) "Amyloid, aluminum and the aetiology of Alzheimer's disease". *Med J Aust* 164, 252-253.
- Feng, R., Rampon, C., Tang, Y. P., Shrom, D., Jin, J., Kyin, M., Sopher, B., Miller, M. W., Ware, C. B., Martin, G. M., Kim, S. H., Langdon, R. B., Sisodia, S. S. i Tsien, J. Z. (2001) "Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces". *Neuron* 32, 911-926.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H. i Kempermann, G. (2003) "Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes". *Mol Cell Neurosci* 23, 373-382.
- Findeis, M. A. (2007) "The role of amyloid beta peptide 42 in Alzheimer's disease". *Pharmacol Ther* 116, 266-286.
- Flint, M., Richardson, E. i Martin, J. (1998) "Enfermedad de Alzheimer y demencias afines". *Harrison TR. Principios de medicina interna. 14ª edición. México: Editorial Interamericana Mc Graw-Hill* 2, 2613-2616.



## *Bibliografia*

- Fratiglioni, L., Paillard-Borg, S. i Winblad, B. (2004) "An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia". *Lancet Neurol* 3, 343-353.
- Friedland, R. P., Fritsch, T., Smyth, K. A., Koss, E., Lerner, A. J., Chen, C. H., Petot, G. J. i Debanne, S. M. (2001) "Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3440-3445.
- Frisardi, V., Solfrizzi, V., Capurso, C., Kehoe, P. G., Imbimbo, B. P., Santamato, A., Dellegrazie, F., Seripa, D., Pilotto, A., Capurso, A. i Panza, F. (2010) "Aluminum in the diet and Alzheimer's disease: from current epidemiology to possible disease-modifying treatment". *J Alzheimers Dis* 20, 17-30.
- Fuentes, S., Colomina, M. T., Vicens, P., Franco-Pons, N. i Domingo, J. L. (2007) "Concurrent exposure to perfluorooctane sulfonate and restraint stress during pregnancy in mice: Effects on postnatal development and behavior of the offspring". *Toxicol Sci* 98, 589-598.
- Galvan, V. i Jin, K. (2007) "Neurogenesis in the aging brain". *Clin Interv Aging* 2, 605-610.
- Gandy, S. i Duff, K. (2000) "Post-menopausal estrogen deprivation and Alzheimer's disease". *Exp Gerontol* 35, 503-511.
- Garcia, T., Esparza, J. L., Vilaro, R., Romeu, M., Domingo, J. L. i Gomez, 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.
- Gauthier, E., Fortier, I., Courchesne, F., Pepin, P., Mortimer, J. i Gauvreau, D. (2000) "Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease". *Environ Res* 84, 234-246.
- Golub, M. S., Germann, S. L., Han, B. i Keen, C. L. (2000) "Lifelong feeding of a high aluminum diet to mice". *Toxicology* 150, 107-117.
- Golub, M. S., Han, B. i Keen, C. L. (1996) "Iron and manganese uptake by offspring of lactating mice fed a high aluminum diet". *Toxicology* 109, 111-118.
- Gomez-Isla, T., Growdon, W. B., McNamara, M. J., Nochlin, D., Bird, T. D., Arango, J. C., Lopera, F., Kosik, K. S., Lantos, P. L., Cairns, N. J. i Hyman, B. T. (1999) "The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes and neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors". *Brain* 122 ( Pt 9), 1709-1719.

- Gomez, M., Esparza, J. L., Cabre, M., Garcia, T. i 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.
- Gómez, T. (2003) "La hipótesis amiloide". *Alzheimer 2003: ¿qué hay de nuevo?*, 57-65.
- Goncalves, P. P. i Silva, V. S. (2007) "Does neurotransmission impairment accompany aluminium neurotoxicity?" *J Inorg Biochem* 101, 1291-1338.
- Gonzalez, M. A., Alvarez Mdel, L., Pisani, G. B., Bernal, C. A., Roma, M. G. i Carrillo, M. C. (2007) "Involvement of oxidative stress in the impairment in biliary secretory function induced by intraperitoneal administration of aluminum to rats". *Biol Trace Elem Res* 116, 329-348.
- Gonzalez, M. A., Roma, M., Bernal, C., Alvarez, M. L. i Carrillo, M. C. (2004) "Biliary secretory function in rats chronically intoxicated with aluminium". *Toxicol Sci* 79, 189-195.
- Gould, E., Reeves, A. J., Graziano, M. S. i Gross, C. G. (1999) "Neurogenesis in the neocortex of adult primates". *Science* 286, 548-552.
- Gourier-Fréry, C. i Fréry, N. (2004) "Aluminium". *EMC-Toxicologie Pathologie* 1, 79-95.
- Gourier-Fréry, C., Fréry, N., Berr, C., Cordier, S., Garnier, R., Isnard, H., Ravault, C. i Renaudeau, C. (2003) "Aluminium. Quels risques pour la santé? Synthèse des études épidémiologiques. " Volet épidémiologique de l'expertise collective INVS-Afssa-Afssaps. Institut de Veille Sanitaire, 270.
- Greenberg, D. A., Jin, K., Galvan, V. i Bredesen, D. E. (2007) "Neurogenesis and Alzheimer's Disease". *Research Progress in Alzheimer's Disease and Dementia* 1, 177-190.
- Gustafson, D., Rothenberg, E., Blennow, K., Steen, B. i Skoog, I. (2003) "An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease". *Arch Intern Med* 163, 1524-1528.
- Hakansson, K., Rovio, S., Helkala, E. L., Vilska, A. R., Winblad, B., Soininen, H., Nissinen, A., Mohammed, A. H. i Kivipelto, M. (2009) "Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study". *Bmj* 339, b2462.
- Hallbergson, A. F., Gnatenco, C. i Peterson, D. A. (2003) "Neurogenesis and brain injury: managing a renewable resource for repair". *J Clin Invest* 112, 1128-1133.
- Hamer, M. i Chida, Y. (2009) "Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence". *Psychol Med* 39, 3-11.
- Hamilton, A. (1901) "The division of differentiated cells in the central nervous system of the white rat". *J. Comp. Neurol.* 11, 297-320.

## *Bibliografia*

- Hascoët, M., Bourin, M. (2009) "The Mouse Light-Dark Box Test". *Neuromethods* 42, 197-223.
- Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S. i Mattson, M. P. (2002) "Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease". *J Neurochem* 83, 1509-1524.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F. i Cole, G. (1996) "Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice". *Science* 274, 99-102.
- Hull, M. J. i Abraham, J. L. (2002) "Aluminum welding fume-induced pneumoconiosis". *Hum Pathol* 33, 819-825.
- Iregren, A., Sjogren, B., Gustafsson, K., Hagman, M., Nylen, L., Frech, W., Andersson, M., Ljunggren, K. G. i Wennberg, A. (2001) "Effects on the nervous system in different groups of workers exposed to aluminium". *Occup Environ Med* 58, 453-460.
- JEFCA (2007) "Safety evaluation of certain food additives and contaminants". World Health Organization, 119-207.
- Jin, K., Galvan, V., Xie, L., Mao, X. O., Gorostiza, O. F., Bredesen, D. E. i Greenberg, D. A. (2004a) "Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13363-13367.
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C. i Greenberg, D. A. (2004b) "Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 343-347.
- Kalaria, R. N., Cohen, D. L., Premkumar, D. R., Nag, S., LaManna, J. C. i Lust, W. D. (1998) "Vascular endothelial growth factor in Alzheimer's disease and experimental cerebral ischemia". *Brain Res Mol Brain Res* 62, 101-105.
- Kee, N., Teixeira, C. M., Wang, A. H. i Frankland, P. W. (2007) "Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus". *Nat Neurosci* 10, 355-362.
- Kempermann, G., Chesler, E. J., Lu, L., Williams, R. W. i Gage, F. H. (2006) "Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 780-785.
- Kempermann, G. i Gage, F. H. (2002) "Genetic influence on phenotypic differentiation in adult hippocampal neurogenesis". *Brain Res Dev Brain Res* 134, 1-12.

- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M. i Gage, F. H. (2003) "Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice". *Development* 130, 391-399.
- Kessels, R. P., de Haan, E. H., Kappelle, L. J. i Postma, A. (2001) "Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions". *Brain Res Brain Res Rev* 35, 295-303.
- King, D. L. i Arendash, G. W. (2002) "Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months". *Physiol Behav* 75, 627-642.
- Kintner, C. (2002) "Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells". *J Neurosci* 22, 639-643.
- Kivipelto, M., Helkala, E. L., Laakso, M. P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Iivonen, S., Mannermaa, A., Tuomilehto, J., Nissinen, A. i Soininen, H. (2002) "Apolipoprotein E epsilon4 allele, elevated midlife total cholesterol level, and high midlife systolic blood pressure are independent risk factors for late-life Alzheimer disease". *Ann Intern Med* 137, 149-155.
- Klatzo, I., Wisniewski, H. i Streicher, E. (1965) "Experimental Production of Neurofibrillary Degeneration. I. Light Microscopic Observations". *J Neuropathol Exp Neurol* 24, 187-199.
- Klein, G. L. (1995) "Aluminium in parenteral solutions revisited-again-". *Am J Clin Nutr* 61, 449-568.
- Klempin, F. i Kempermann, G. (2007) "Adult hippocampal neurogenesis and aging". *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 271-280.
- Koh, J. Y., Yang, L. L. i Cotman, C. W. (1990) "Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage". *Brain Res* 533, 315-320.
- Kozorovitskiy, Y. i Gould, E. (2003) "Adult neurogenesis: a mechanism for brain repair?" *J Clin Exp Neuropsychol* 25, 721-732.
- Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A. M. i 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.

## *Bibliografia*

- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. i Gage, F. H. (1996) "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation". *J Neurosci* 16, 2027-2033.
- Kuhn, H. G., Palmer, T. D. i Fuchs, E. (2001) "Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage". *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251, 152-158.
- Kuroda, Y. i Kawahara, M. (1994) "Aggregation of amyloid beta-protein and its neurotoxicity: enhancement by aluminum and other metals". *Tohoku J Exp Med* 174, 263-268.
- Kvech, S. i Edwards, M. (2002) "Solubility controls on aluminum in drinking water at relatively low and high pH". *Water Res* 36, 4356-4368.
- Launer, L. J. i Hofman, A. (2000a) "Frequency and impact of neurologic diseases in the elderly of Europe: A collaborative study of population-based cohorts". *Neurology* 54, S1-8.
- Launer, L. J., Ross, G. W., Petrovitch, H., Masaki, K., Foley, D., White, L. R. i Havlik, R. J. (2000b) "Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study". *Neurobiol Aging* 21, 49-55.
- Lautenschlager, N. T., Cox, K. L., Flicker, L., Foster, J. K., van Bockxmeer, F. M., Xiao, J., Greenop, K. R. i Almeida, O. P. (2008) "Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial". *Jama* 300, 1027-1037.
- Lazarov, O., Robinson, J., Tang, Y. P., Hairston, I. S., Korade-Mirnic, Z., Lee, V. M., Hersh, L. B., Sapolsky, R. M., Mirnic, K. i Sisodia, S. S. (2005) "Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice". *Cell* 120, 701-713.
- Lee, J., Duan, W., Long, J. M., Ingram, D. K. i Mattson, M. P. (2000) "Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats". *J Mol Neurosci* 15, 99-108.
- Lee, J., Seroogy, K. B. i Mattson, M. P. (2002) "Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice". *J Neurochem* 80, 539-547.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M. i Abrous, D. N. (2000) "Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11032-11037.
- Letzel, S., Lang, C. J., Schaller, K. H., Angerer, J., Fuchs, S., Neundorfer, B. i Lehnert, G. (2000) "Longitudinal study of neurotoxicity with occupational exposure to aluminum dust". *Neurology* 54, 997-1000.

- Liao, Y. H., Yu, H. S., Ho, C. K., Wu, M. T., Yang, C. Y., Chen, J. R. i Chang, C. C. (2004) "Biological monitoring of exposures to aluminium, gallium, indium, arsenic, and antimony in optoelectronic industry workers". *J Occup Environ Med* 46, 931-936.
- Llobet, J. M., Colomina, M. T., Sirvent, J. J., Domingo, J. L. i Corbella J. (1995) "Reproductive toxicology of aluminum in male mice". *Toxicol Sci* 25, 45-51.
- Lois, C. i Alvarez-Buylla, A. (1994) "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain". *Science* 264, 1145-1148.
- Lopez-Garcia, C. (1993) "Postnatal neurogenesis and regeneration in the lizard cerebral cortex". *Neuronal Cell Death and Repair*, 237-246.
- Luchsinger, J. A., Tang, M. X., Shea, S. i Mayeux, R. (2004) "Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease". *Neurology* 63, 1187-1192.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P. i Kivipelto, M. (2010) "Alzheimer's disease: clinical trials and drug development". *Lancet Neurol* 9, 702-716.
- Manly, J. J., Merchant, C. A., Jacobs, D. M., Small, S. A., Bell, K., Ferin, M. i Mayeux, R. (2000) "Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women". *Neurology* 54, 833-837.
- Manzano, S., Gonzalez, J., Marcos, A., Payno, M., Villanueva, C. i Matias-Guiu, J. (2009) "Experimental models in Alzheimer's disease". *Neurologia* 24, 255-262.
- Marin, R., Guerra, B., Hernandez-Jimenez, J. G., Kang, X. L., Fraser, J. D., Lopez, F. J. i Alonso, R. (2003) "Estradiol prevents amyloid-beta peptide-induced cell death in a cholinergic cell line via modulation of a classical estrogen receptor". *Neuroscience* 121, 917-926.
- Martin, S. J. i Morris, R. G. (2002) "New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited". *Hippocampus* 12, 609-636.
- Martínez, J. M. i Robles, A. (2001) "Alzheimer 2001: teoría y práctica". Aula Médica.
- Martyn, C. N., Coggon, D. N., Inskip, H., Lacey, R. F. i Young, W. F. (1997) "Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease". *Epidemiology* 8, 281-286.
- Mattson, M. P. (1997) "Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives". *Physiol Rev* 77, 1081-1132.
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H. i Hen, R. (2006) "Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment". *Nat Neurosci* 9, 729-731.

## *Bibliografia*

- Migliore, L. i Coppede, F. (2009) "Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases". *Mutat Res* 667, 82-97.
- Ming, G. L. i Song, H. (2005) "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system". *Annu Rev Neurosci* 28, 223-250.
- Mirescu, C. i Gould, E. (2006) "Stress and adult neurogenesis". *Hippocampus* 16, 233-238.
- Mohapel, P., Leanza, G., Kokaia, M. i Lindvall, O. (2005) "Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning". *Neurobiol Aging* 26, 939-946.
- Molinuevo, J. L. i Blesa, R. (2004) "Demencia: una epidemia en el siglo XXI". *JANO* . 1.537.
- Moore, P. B., Day, J. P., Taylor, G. A., Ferrier, I. N., Fifield, L. K. i Edwardson, J. A. (2000) "Absorption of Aluminium-26 in Alzheimer's Disease, Measured Using Accelerator Mass Spectrometry". *Dement Geriatr Cogn Disord* 11, 66-69.
- Morgado-Bernal, I. (2011) "Learning and memory consolidation: linking molecular and behavioral data". *Neuroscience* 176, 12-19.
- Morris, R. (1984) "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat". *J. Neurosci. Methods* 11, 47-60.
- Morinaga, A., Hirohata, M., Ono, K. i Yamada, M. (2007) "Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro". *Biochem Biophys Res Commun* 359, 697-702.
- Murayama, H., Shin, R. W., Higuchi, J., Shibuya, S., Muramoto, T. i Kitamoto, T. (1999) "Interaction of aluminum with PHFtau in Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration evidenced by desferrioxamine-assisted chelating autoclave method". *Am J Pathol* 155, 877-885.
- Nayak, P. (2002) "Aluminum: impacts and disease". *Environ Res* 89, 101-115.
- Nayak, P. i Chatterjee, A. K. (1999) "Biochemical view of aluminum-induced neurohazards". *J Environ Biol* 20, 77-84.
- Nday, C. M., Drever, B. D., Salifoglou, T. i Platt, B. (2010) "Aluminum does not enhance beta-amyloid toxicity in rat hippocampal cultures". *Brain Res* 1352, 265-276.
- Newman, M., Musgrave, I. F. i Lardelli, M. (2007) "Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models". *Biochim Biophys Acta* 1772, 285-297.
- OEHHA. (2001) "Public health goal for aluminium in drinking water". Office of Environmental Health Hazard Assessment. California environmental protection agency., 68 p.

- Olson, A. K., Eadie, B. D., Ernst, C. i Christie, B. R. (2006) "Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways". *Hippocampus* 16, 250-260.
- Palmer, T. D., Willhoite, A. R. i Gage, F. H. (2000) "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis". *J Comp Neurol* 425, 479-494.
- Pavez, F. A. i Ramírez, L. A. (2007) "Modelos de daño cerebral en Enfermedad de Alzheimer: una breve revisión ". *Psicogeriatría publicaciones*.
- Perl, D. P. (2001) "The association of Aluminium and Neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease, a personal perspective". In: Exley C, editor. *Aluminium and Alzheimer's disease The science that describes the Link*. Amsterdam: Elsevier, 133-146.
- Peters, R., Peters, J., Warner, J., Beckett, N. i Bulpitt, C. (2008) "Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review". *Age Ageing* 37, 505-512.
- Pratico, D., Uryu, K., Sung, S., Tang, S., Trojanowski, J. Q. i Lee, V. M. (2002) "Aluminum modulates brain amyloidosis through oxidative stress in APP transgenic mice". *FASEB J* 16, 1138-1140.
- Radon, K., Nowak, D. i Szadkowski, D. (1999) "Lack of combined effects of exposure and smoking on respiratory health in aluminium potroom workers". *Occup Environ Med* 56, 468-472.
- Ramirez-Amaya, V., Marrone, D. F., Gage, F. H., Worley, P. F. i Barnes, C. A. (2006) "Integration of new neurons into functional neural networks". *J Neurosci* 26, 12237-12241.
- Rebai, O. i Djebli, N. E. (2008) "Chronic Exposure to Aluminum Chloride in Mice: Exploratory Behaviors and Spatial Learning". *Advances in Biological Research* 2 26-33.
- Riihimaki, V., Hanninen, H., Akila, R., Kovala, T., Kuosma, E., Paakkulainen, H., Valkonen, S. i Engstrom, B. (2000) "Body burden of aluminum in relation to central nervous system function among metal inert-gas welders". *Scand J Work Environ Health* 26, 118-130.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G. i Murri, L. (2003) "Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review". *Brain Res Bull* 61, 1-24.
- Rogers, J. L. i Kesner, R. P. (2006) "Lesions of the dorsal hippocampus or parietal cortex differentially affect spatial information processing". *Behav Neuro* 120, 852-860.
- Rogers, J. L. i Kesner, R. P. (2007) "Hippocampal-parietal cortex interactions: evidence from a disconnection study in the rat". *Behav Brain Res* 179, 19-27.



## *Bibliografia*

- Rogers, M. A. i Simon, D. G. (1999) "A preliminary study of dietary aluminium intake and risk of Alzheimer's disease". *Age Ageing* 28, 205-209.
- Roider, G. i Drasch, G. (1999) "Concentration of aluminum in human tissues : investigations on an occupationally non-exposed population in Southern Bavaria (Germany)". *Trace elements and electrolytes* 16, 77-86
- Roig, J. L., Fuentes, S., Teresa Colomina, M., Vicens, P. i Domingo, J. L. (2006) "Aluminum, restraint stress and aging: behavioral effects in rats after 1 and 2 years of aluminum exposure". *Toxicology* 218, 112-124.
- Romano, M. F., Nissen, M. D., Del Huerto, N. M. i Parquet, C. A. (2007) "Enfermedad de Alzheimer". *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina*. 175.
- Rondeau, V., Commenges, D., Jacqmin-Gadda, H. i Dartigues, J. F. (2000) "Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: an 8-year follow-up study". *Am J Epidemiol* 152, 59-66.
- Rondeau, V., Jacqmin-Gadda, H., Commenges, D., Helmer, C. i Dartigues, J. F. (2009) "Aluminum and silica in drinking water and the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort". *Am J Epidemiol* 169, 489-496.
- Rosborg, I., Nihlgard, B., Gerhardsson, L., Gernersson, M. L., Ohlin, R. i Olsson, T. (2005) "Concentrations of inorganic elements in bottled waters on the Swedish market". *Environ Geochem Health* 27, 217-227.
- Sando, S. B., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L. R., Lydersen, S. i Aasly, J. (2008) "Risk-reducing effect of education in Alzheimer's disease". *Int J Geriatr Psychiatry* 23, 1156-1162.
- Santin, L. J., Rubio, S., Begega, A., Miranda, R. i Arias, J. L. (2000) "Spatial learning and the hippocampus". *Rev Neurol* 31, 455-462.
- Sarasa, M. (2006) "Experimental models for Alzheimer's disease research". *Rev Neurol* 42, 297-301.
- Save, E. i Poucet, B. (2000) "Involvement of the hippocampus and associative parietal cortex in the use of proximal and distal landmarks for navigation". *Behav Brain Res* 109, 195-206.
- Saxe, M. D., Battaglia, F., Wang, J. W., Malleret, G., David, D. J., Monckton, J. E., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Kandel, E. R., Santarelli, L., Hen, R. i Drew, M. R. (2006) "Ablation of

- hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus". *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17501-17506.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Schupf, N., Brickman, A. M., Cosentino, S., Tang, M. X. i Stern, Y. (2009) "Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease". *Jama* 302, 627-637.
- Scharf, M. T., Woo, N. H., Lattal, K. M., Young, J. Z., Nguyen, P. V. i Abel, T. (2002) "Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training". *J Neurophysiol* 87, 2770-2777.
- Schintu, M., Meloni, P. i Contu, A. (2000) "Aluminum fractions in drinking water from reservoirs". *Ecotoxicol Environ Saf* 46, 29-33.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. i Bischofberger, J. (2004) "Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus". *Nature* 429, 184-187.
- Schmidt, R., Schmidt, H., Curb, J. D., Masaki, K., White, L. R. i Launer, L. J. (2002) "Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study". *Ann Neurol* 52, 168-174.
- Sharma, S., Rakoczy, S. i Brown-Borg, H. (2010) "Assessment of spatial memory in mice". *Life Sci* 87, 521-536.
- Shin, R. W., Lee, V. M. i Trojanowski, J. Q. (1995) "Neurofibrillary pathology and aluminum in Alzheimer's disease". *Histol Histopathol* 10, 969-978.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T. i Gould, E. (2001) "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories". *Nature* 410, 372-376.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. i Gould, E. (2002) "Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning". *Hippocampus* 12, 578-584.
- Sills, R. C., Valentine, W. M., Moser, V., Graham, D. J. i Morgan, D. L. (2000) "Characterization of carbon disulfide neurotoxicity in C57BL6 mice: behavioral, morphologic, and molecular effects". *Toxicol Pathol* 28, 142-148.
- Sisti, H. M., Glass, A. L. i Shors, T. J. (2007) "Neurogenesis and the spacing effect: learning over time enhances memory and the survival of new neurons". *Learn Mem* 14, 368-375.
- Soni, M. G., White, S. M., Flamm, W. G. i Burdock, G. A. (2001) "Safety evaluation of dietary aluminum". *Regul Toxicol Pharmacol* 33, 66-79.
- Spofforth, J. (1921) "Case of aluminium poisoning". *Lancet* 2, 1301.

## *Bibliografia*

- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M. D., Reuter, K. i Kempermann, G. (2004) "Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice". *Glia* 46, 41-52.
- Tarkowski, E., Issa, R., Sjogren, M., Wallin, A., Blennow, K., Tarkowski, A. i Kumar, P. (2002) "Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia". *Neurobiol Aging* 23, 237-243.
- Tashiro, A., Makino, H. i Gage, F. H. (2007) "Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage". *J Neurosci* 27, 3252-3259.
- Taupin, P. i Gage, F. H. (2002) "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals". *J Neurosci Res* 69, 745-749.
- Thompson, A., Boekhoorn, K., Van Dam, A. M. i Lucassen, P. J. (2008) "Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence?" *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1, 28-42.
- Toimela, T. (2004) "Evaluation of Neurotoxicity of Mercury Compounds and Aluminum in Cell Cultures". *Acta Universitatis Tamperensis* 1007.
- Tronel, S., Fabre, A., Charrier, V., Olier, S. H., Gage, F. H. i Abrous, D. N. (2010) "Spatial learning sculpts the dendritic arbor of adult-born hippocampal neurons". *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7963-7968.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P. i Abraham, W. C. (2003) "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory". *Prog Neurobiol* 70, 1-32.
- Varrica, D., Aiuppa, A. i Dongarra, G. (2000) "Volcanic and anthropogenic contribution to heavy metal content in lichens from Mt. Etna and Vulcano island (Sicily)". *Environ Pollut* 108, 153-162.
- Verdile, G., Fuller, S., Atwood, C. S., Laws, S. M., Gandy, S. E. i Martins, R. N. (2004) "The role of beta amyloid in Alzheimer's disease: still a cause of everything or the only one who got caught?" *Pharmacol Res* 50, 397-409.
- Vicens, P., Redolat, R. i Carrasco, M. C. (2003) "Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones". *Psicothema* 15, 539-544.
- Walton, J. R. (2006) "Aluminum in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease". *Neurotoxicology* 27, 385-394.

- Walton, J. R. i Wang, M. X. (2009) "APP expression, distribution and accumulation are altered by aluminum in a rodent model for Alzheimer's disease". *J Inorg Biochem* 103, 1548-1554.
- Wang, B., Xing, W., Zhao, Y. F. i Deng, X. (2010) "Effects of chronic aluminum exposure on memory through multiple signal transduction pathways". *Environmental Toxicology and Pharmacology* 29, 308-313.
- Wang, R., Dineley, K. T., Sweatt, J. D. i Zheng, H. (2004) "Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning and impaired adult neurogenesis". *Neuroscience* 126, 305-312.
- Wang, S., Scott, B. W. i Wojtowicz, J. M. (2000) "Heterogenous properties of dentate granule neurons in the adult rat". *J Neurobiol* 42, 248-257.
- Wei, L. C., Shi, M., Chen, L. W., Cao, R., Zhang, P. i Chan, Y. S. (2002) "Nestin-containing cells express glial fibrillary acidic protein in the proliferative regions of central nervous system of postnatal developing and adult mice". *Brain Res Dev Brain Res* 139, 9-17.
- Wen, P. H., Shao, X., Shao, Z., Hof, P. R., Wisniewski, T., Kelley, K., Friedrich, V. L. J., Ho, L., Pasinetti, G. M., Shioi, J., Robakis, N. K. i Elder, G. A. (2002) "Overexpression of wild type but not an FAD mutant presenilin-1 promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice." *Neurobiol Dis.* 10, 8-19.
- Wenk, G. L. (2004) "Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze". *Curr Protoc Neurosci Chapter 8, Unit 8 5A.*
- Winkler, J., Thal, L. J., Gage, F. H. i Fisher, L. J. (1998) "Cholinergic strategies for Alzheimer's disease". *J Mol Med* 76, 555-567.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J. i Kuhn, H. G. (2002) "Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb". *Eur J Neurosci* 16, 1681-1689.
- Wolf, S. A., Kronenberg, G., Lehmann, K., Blankenship, A., Overall, R., Staufenbiel, M. i Kempermann, G. (2006) "Cognitive and physical activity differently modulate disease progression in the amyloid precursor protein (APP)-23 model of Alzheimer's disease". *Biol Psychiatry* 60, 1314-1323.
- Yokel, R. A. i McNamara, P. J. (2001) "Aluminium toxicokinetics: an updated minireview". *Pharmacol Toxicol* 88, 159-167.

## *Bibliografia*

- Yokel, R. A. i O'Callaghan, J. P. (1998) "An aluminum-induced increase in GFAP is attenuated by some chelators". *Neurotoxicol Teratol* 20, 55-60.
- Yu, Y., He, J., Zhang, Y., Luo, H., Zhu, S., Yang, Y., Zhao, T., Wu, J., Huang, Y., Kong, J., Tan, Q. i Li, X. M. (2009) "Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model". *Hippocampus* 19, 1247-1253.
- Yumoto, S., Horino, Y., Mokuno, Y., Kakimi, S. i Fujii, K. (1996) "Microprobe PIXE analysis of aluminium in the brains of patients with Alzheimer's disease". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 109-110, 362-367.
- Yumoto, S., Kakimi, S., Ohsaki, A. i 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.
- Yumoto, S., Nagai, H., Matsuzaki, H., Matsumura, H., Tada, W., Nagatsuma, E. i Kobayashi, K. (2001) "Aluminium incorporation into the brain of rat fetuses and sucklings". *Brain Res Bull* 55, 229-234.
- Zatta, P., Lucchini R., van Rensburg, S.J. i Taylor, A. (2003) "The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc". *Brain Res Bull* 62, 15-28.
- Zhang, C., McNeil, E., Dressler, L. i Siman, R. (2007) "Long-lasting impairment in hippocampal neurogenesis associated with amyloid deposition in a knock-in mouse model of familial Alzheimer's disease". *Exp Neurol* 204, 77-87.
- Zhang, C. L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H. i Evans, R. M. (2008) "A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour". *Nature* 451, 1004-1007.
- Zhao, C., Deng, W. i Gage, F. H. (2008) "Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis". *Cell* 132, 645-660.

## ***VIII. ANNEX***



## BATERIA D'OBSERVACIÓ FUNCIONAL

### 1- Observació a la seva pròpia gàbia (1 min)

El dia abans s'han d'escollir les gàbies a explorar perquè siguin visibles a l'observador sense moure-les.

**Material:** Full de registre, cronòmetre (**Annex C1**)

S'ha de realitzar sense moure la gàbia del rac on està localitzada i es farà durant un període de 1 min.

La conducta dels animals a la gàbia s'observa des d'una distància prudencial (20cm), posar el timer a 1 min i comptabilitzar el nombre de:

Rearings o aixecaments verticals

Vegades que menja

Vegades que beu

Vegades que realitza la conducta de grooming o conducta de neteja

Vegades que escala a la reixa superior

#### Condicions de la puntuació.

1. Només comptabilitzar si les dues potes davanteres deixen de tocar el terra, dos rearings consecutius implica que les potes davanteres han arribat a tocar terra

2. Es puntea menjar només si menja no si olora o juga amb el menjar

3. Climbing es escalar a la reixa de la gàbia quan escala fa un rearing inicial que es computa com a tal.

4. Estereotípies. Voltes, rearings rítmics, cercles.

5. Anotar altres conductes anòmales.

### Annex C1

#### Observació a la seva pròpia gàbia (1 min)

	SCORE	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí
Postura Inicial	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Arousal	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
Rearings						
N. menja						
N. beu						
Grooming						
Escalar						
Altres						



Annex

## 2- Reacció del ratolí a la ma (30 seg)

Treure el ratolí de la caixa per la cua i col·locar-lo al palmell de la ma i observar la conducta del ratolí.

**Material:** Full de registre, cronòmetre (**Annex C2**)

Condicions de puntuació.

1. La resposta normal es puntua com a 2. Si l'animal no es mou i està letàrgic es puntua com a 1.
2. Si presenta piloerecció inicial s'ha de passar la ma i aplanar el pel per veure si es manté, només si es manté es puntua com a piloerecció.
3. Anotar altres alteracions que es puguin observar, en els bigotis, les orelles ...
4. Si presenta piloerecció inicial s'ha de passar la ma i aplanar el pel per veure si es manté, només si es manté es puntua com a piloerecció.
5. Anotar altres alteracions que es puguin observar, en els bigotis, les orelles ...

## Annex C2

### Reacció del ratolí a la ma (30 seg)

	Score	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí
RESPOSTA INICIAL	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
REACCIÓ A LA MA	1					
	2					
	3					
	4					
SALIVACIÓ	1					
	2					
	3					
LLAGRIMEIG	1					
	2					
	3					
PILOERECIÓ	0					
	+					
PELATGE/	0					
	+					
TANCAMENT PALPEBRAL	1					
	2					
	3					
	4					

### 3- Resposta a les manipulacions

Posar l'animal en un espai obert.

**Material:** granota clicker, palets *torundes de cotó*, Full de registre (**Annex C3**).

**Resposta a l'aproximació:** espera fins que el ratolí es mogui i col·locar el cotó davant del seu nas.

**Resposta al contacte:** Tocar amb un cotó un lateral preferiblement quan el ratolí s'ha aturat.

**Resposta auditiva:** Mantenir el clicker per sobre del seu cap i observa les orelles que son les més fàcils d'observar per respostes mínimes.

#### Annex C3

##### Resposta a les manipulacions

CONDICIÓ	SCORE	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí	Grup/ratolí
Resposta Apropament	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Resposta Contacte	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Resposta Auditiva CLICK	1					
	2					
	3					
	4					
	5					