

ETHANOL IMPAIRS EXTRACELLULAR ZINC INTAKE IN CULTURED ASTROCYTES

El etanol altera la captura de zinc por astrocitos en cultivo

Ponsoda X. (1), Ballestin R. (2), Molowny, A. (1), Marin M.P. (2), Esteban-Pretel G. (2),
Romero A.M. (2), Renau-Piqueras J. (2) y Lopez-Garcia C. (1)

(1) Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia

(2) Sección de Biología Celular y Patología, Hospital “La Fe”, Valencia

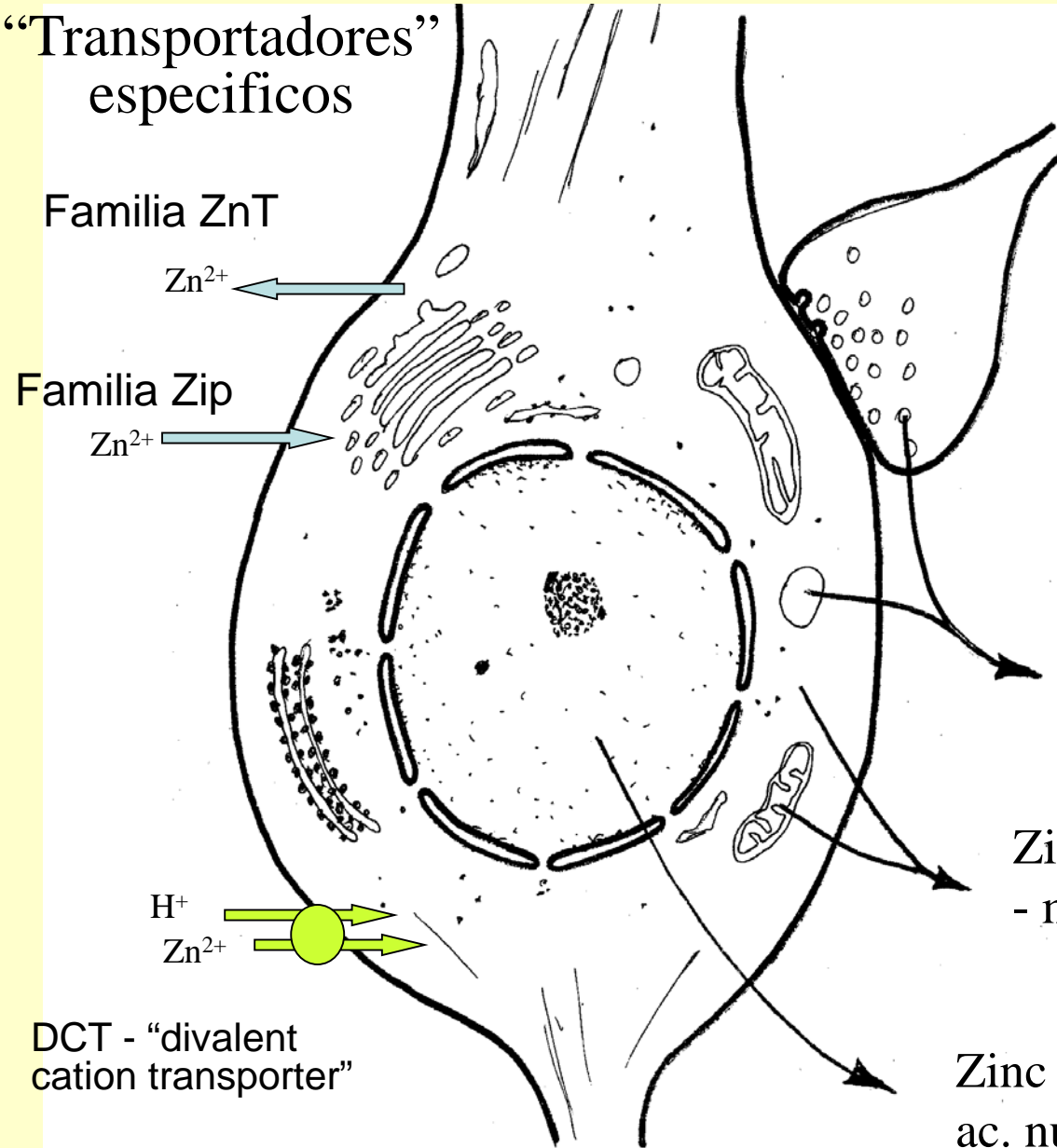
Distribución de zinc

“Transportadores”
especificos

Familia ZnT

Familia Zip

DCT - “divalent
cation transporter”



- ZnT (6 seg. trans.), sacan zinc de citoplasma.
- ZnT1 - en membrana plasmatica
- ZnT2 - endomembranas
- ZnT3 - vesiculas sinapticas.
- ZnT4 - glandula mamaria (“lethal milk syndrome”)
- ZnT5 - pancreas,, cels beta granos de insulina.
- ZnT6 - “red trans” del Ap. Golgi.
- (mas de 9 tipos)

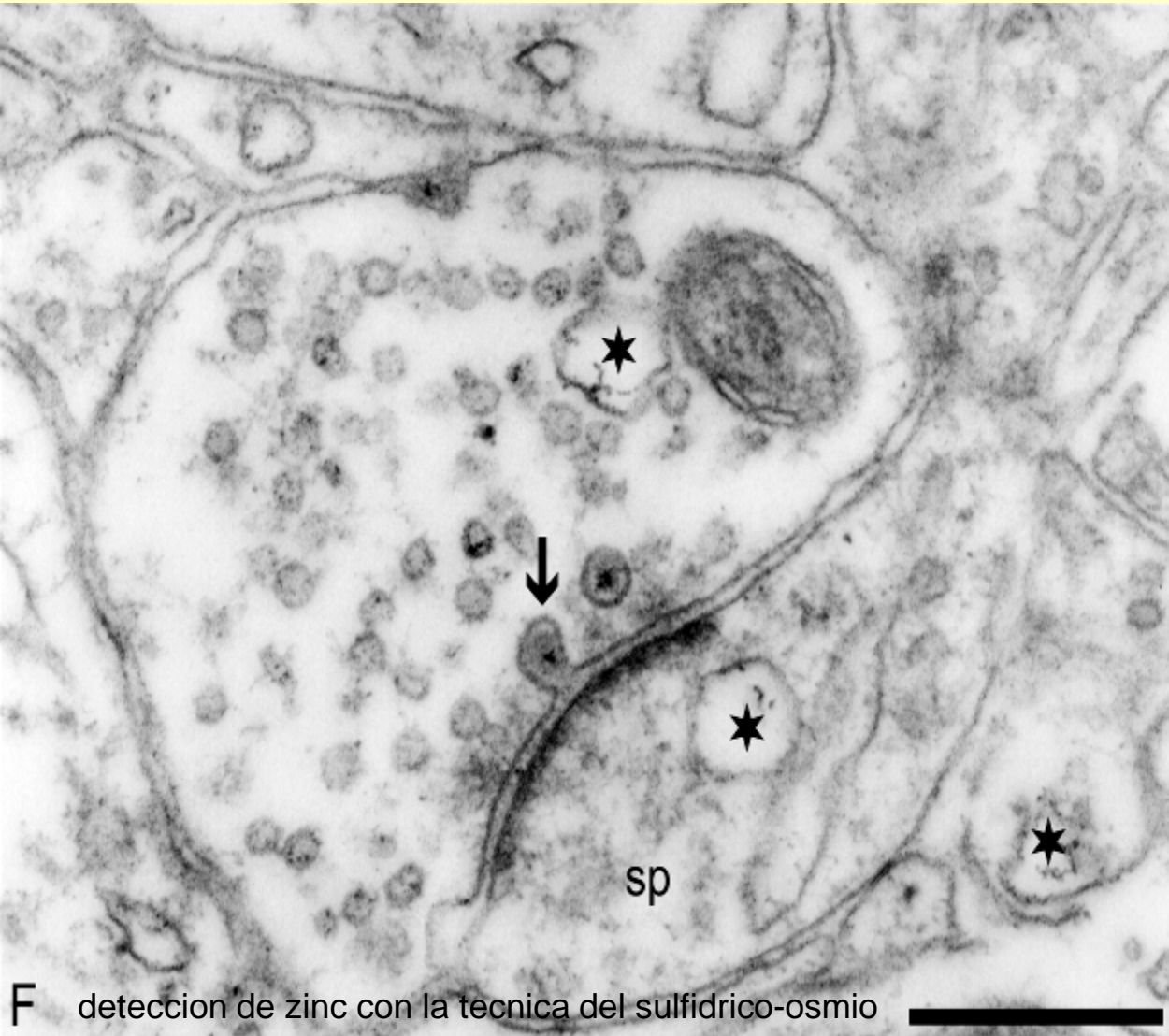
- ZIP (8 seg. trans.), meten zinc al citoplasma.
- ZIP1 - Ubicuo.
- ZIP2 - Utero
- ZIP3 - Testiculo
- ZIP4 - Intestino.
- ... (mas de 14 tipos)

“Zinc vesicular” 15 a 20%

Zinc “labil”, citoplasmatico
- metaltioneinas, 30 a 35%

Zinc “uniones estables”, 50%
ac. nucleicos, factores transcripcion

El zinc “sináptico”



F detección de zinc con la técnica del sulfídrico-osmio

El “zinc sináptico” se libera junto el neurotransmisor durante la transmisión sináptica

Acción de iones zinc sobre neuroreceptores:

- excitadores (NMDA) ↓
- inhibidores (GABA) ↓
- canales iónicos dependientes de voltaje ↓

(efecto “balsámico-neuroprotector” en casos de trauma o hiperactividad sináptica)

Captura y reciclado del zinc sináptico liberado:

LA GLIA PERISINÁPTICA

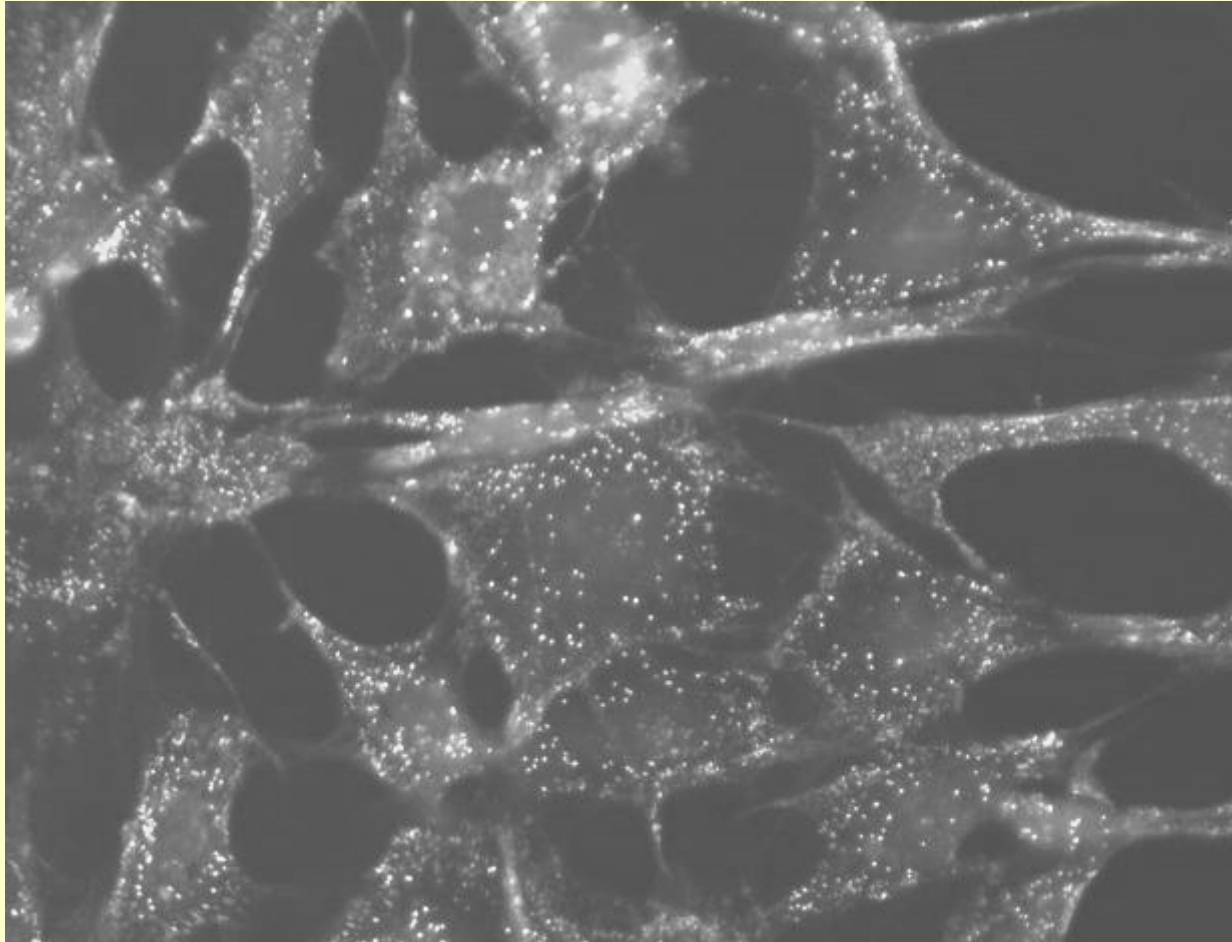
Canales

Transportadores

Endocitosis

....

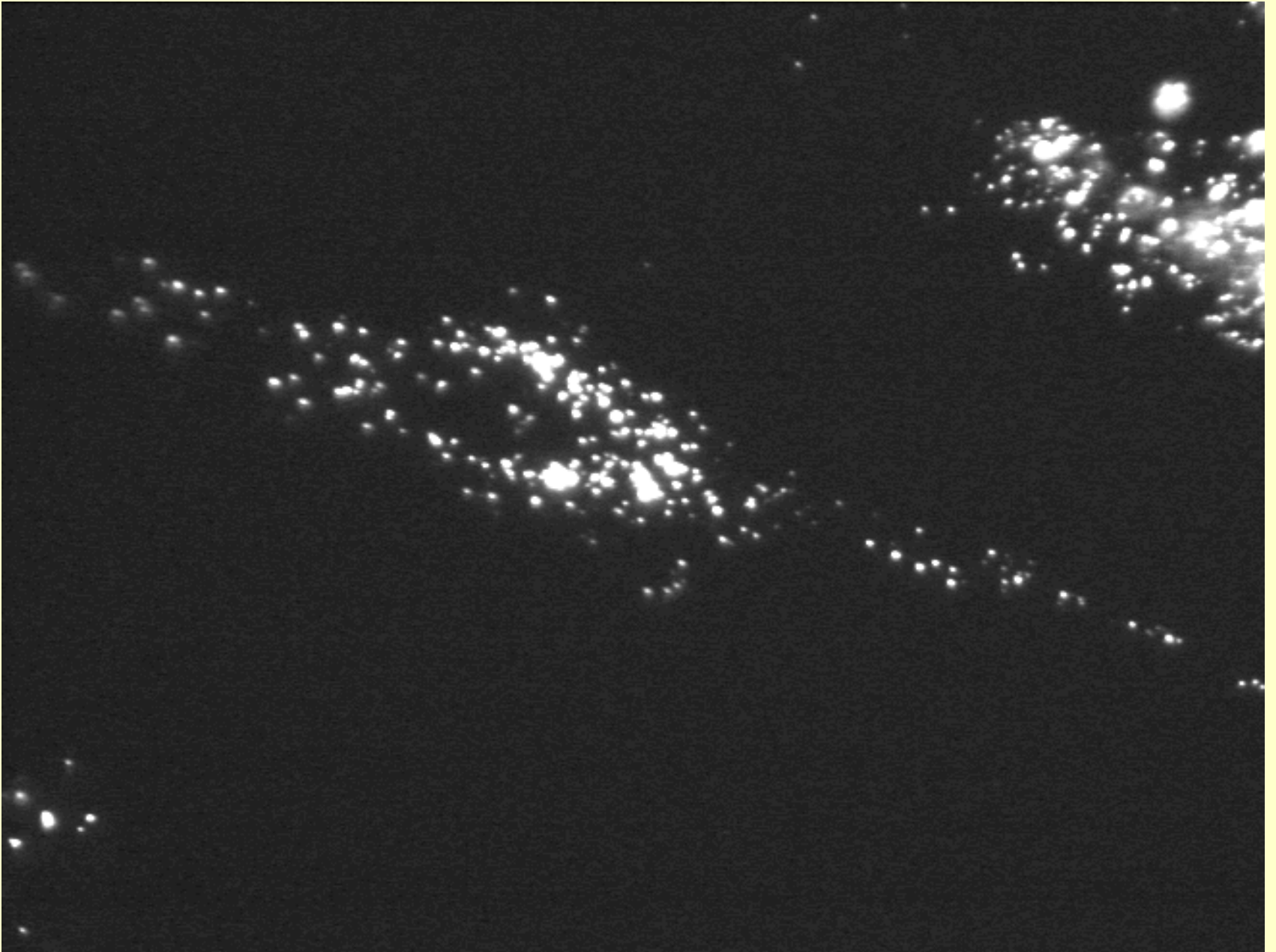
En astrocitos, los “zincosomas” son un indicador de la correcta captura y manipulación del zinc exogeno



Los zincosomas aparecen tras breve tratamiento con zinc extracelular

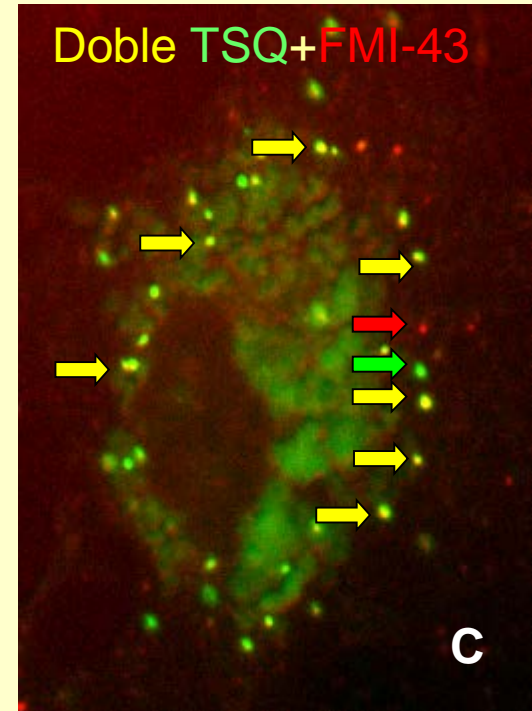
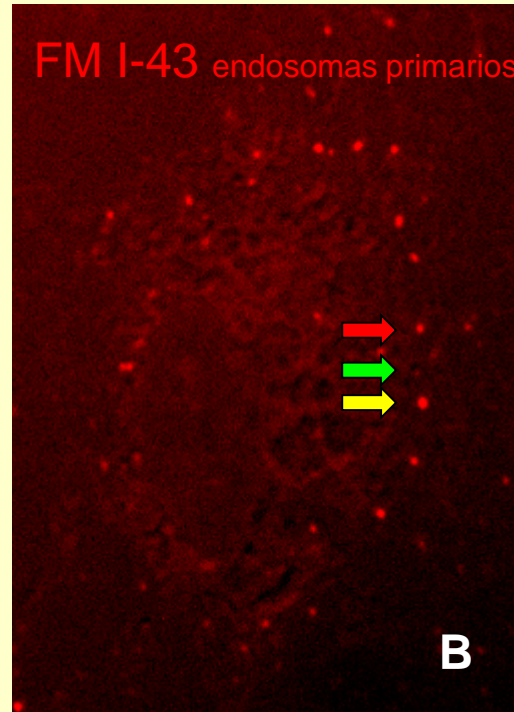
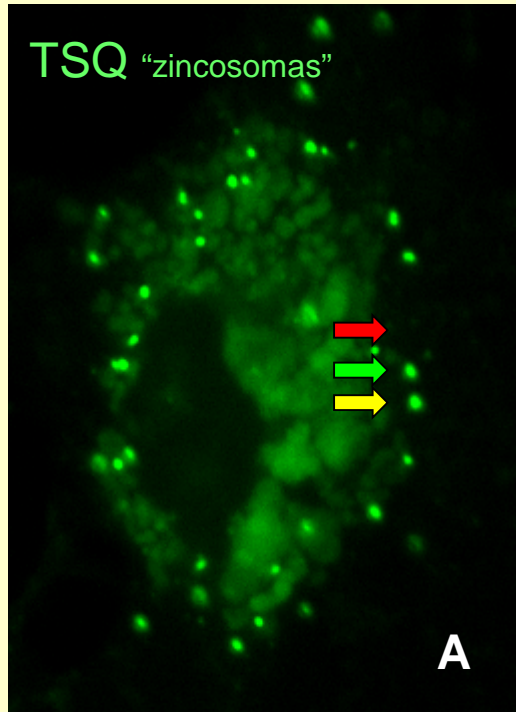
TSQ - (5-15 min en 5-50 μ m ZnSO₄) - TSQ

Los zincosomas son estructuras de vida muy corta (minutos-horas), muy dinamicas, que acaban conduciendo el zinc exogeno hacia lisosomas y mitocondrias



Los endosomas primarios aparecen cargados con zinc a los pocos minutos de exposicion.

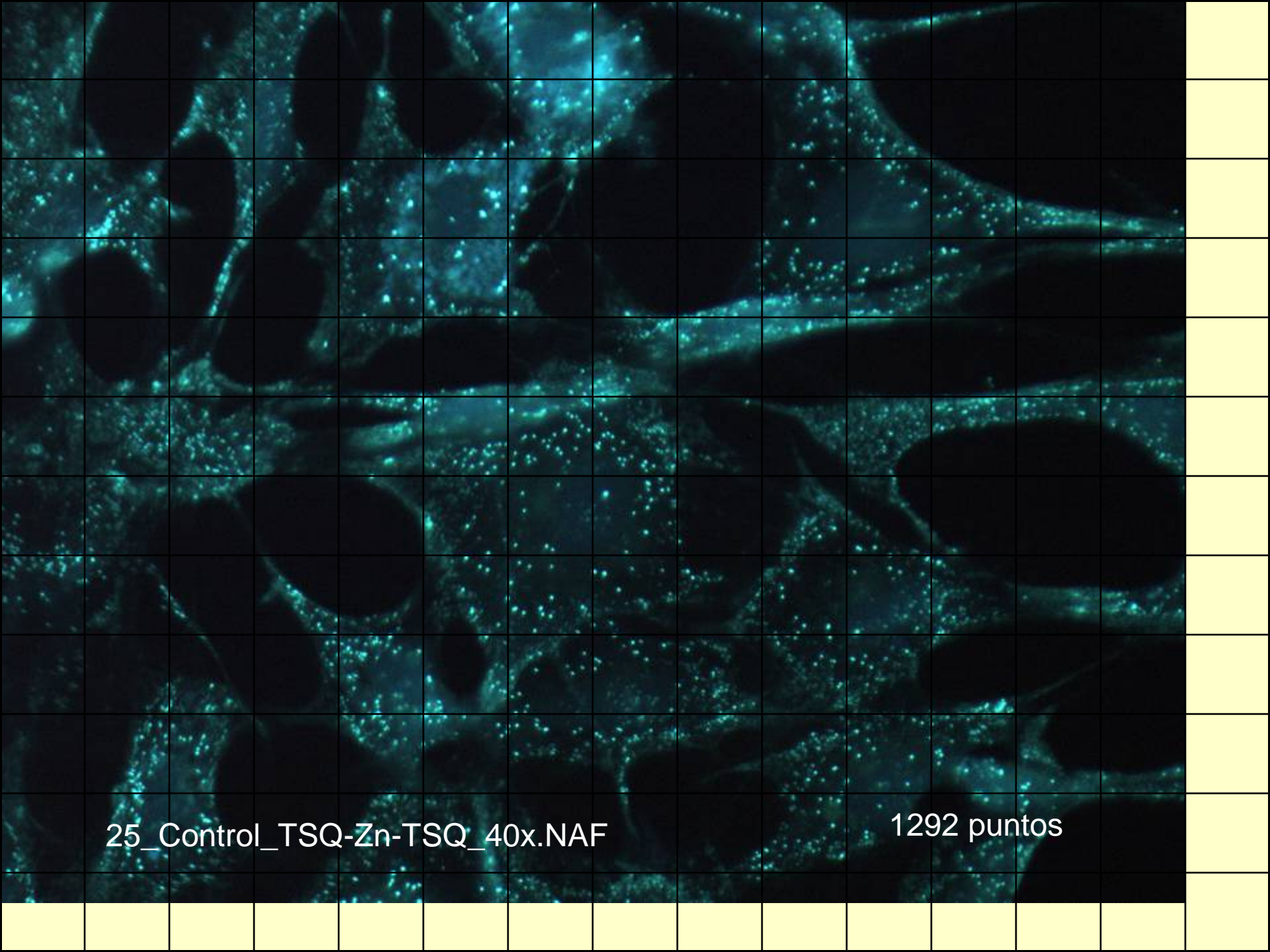
Despues pasan el zinc exogeno capturado al compartimento lisosomico.



Efectos del alcohol

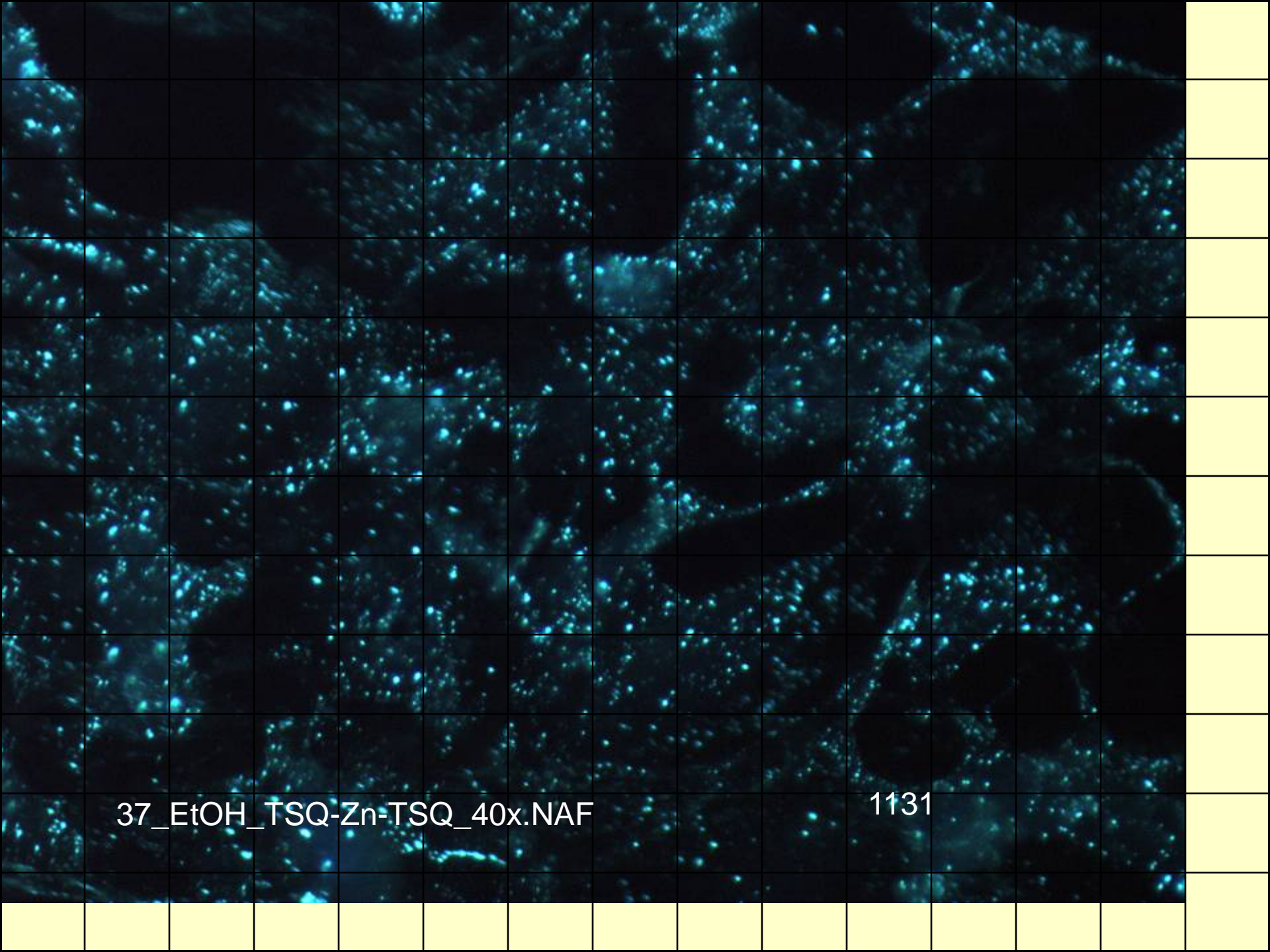
El modelo experimental:

- Cultivos primarios de astrocitos (de una a dos semanas de edad)
- Tratamiento con TPEN (extracción del zinc iónico de las células)
- Tratamiento con TSQ (marca el zinc unido débilmente a proteínas y ácidos nucleicos), los complejos TSQ-Zn quedan anclados a membranas
- Tratamiento con zinc añadido al cultivo (5-15 min en 5-50 μM ZnSO_4)
- Nuevo tratamiento con TSQ que marca el zinc capturado (“zincosomas”)
- Observación en fluorescencia UV y muestreo de cultivos controles-tratados con etanol



25_Control_TSQ-Zn-TSQ_40x.NAF

1292 puntos



37_EtOH_TSQ-Zn-TSQ_40x.NAF

1131

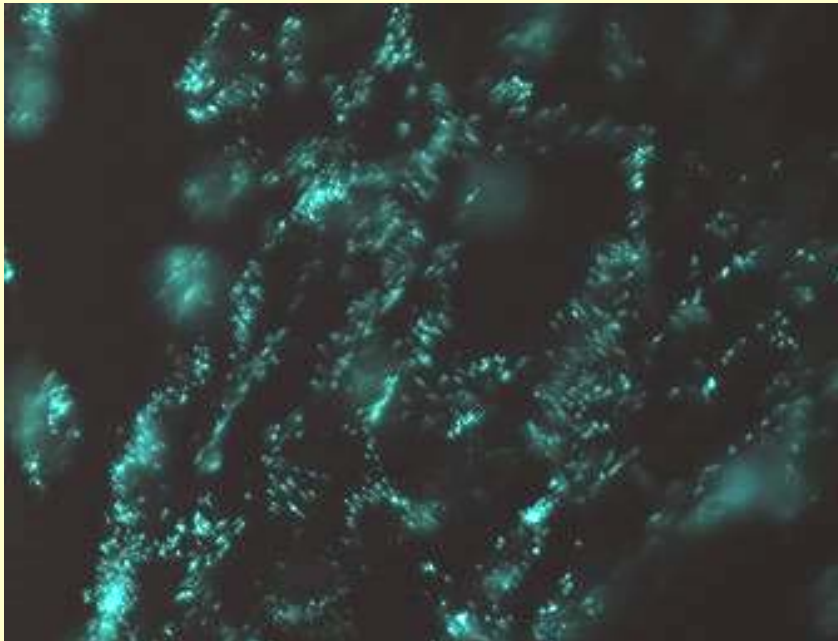
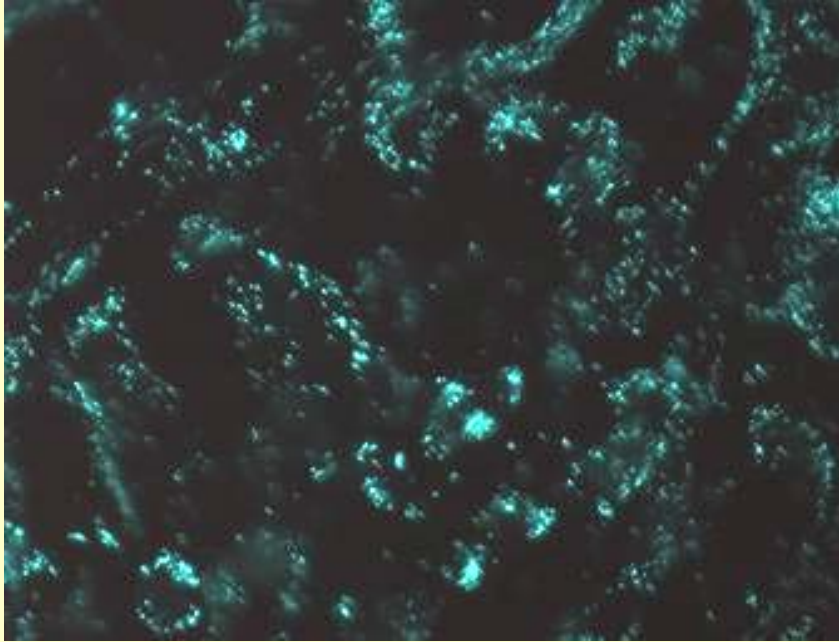
Densidad de zincosomas en celulas controles – tratadas con etanol

	Puntos “zincosomas”	Pixels “area de las celulas”	Unidades de fluorescencia	Densidad zincosomas/area (x10 ⁻³)
25_Control_TSQ-Zn- TSQ_40x	1292	1002871	339.109	1.28
37_EtOH_TSQ-Zn- TSQ_40x	1131	1228162	299.483	0.92

La densidad de zincosomas/area en celulas tratadas con etanol disminuye (aproximadamente al 63% del valor de los controles)

Control	Etanol	%
56.9	40.1	70.5
1134	950	83.7
680.7	597.8	87.8
129.8	37.7	29
310.7	293.9	94.6
488	340.5	70
334	457	136.8
1890	758	40
679.4	126	18.8
633.7	400.1	63.1

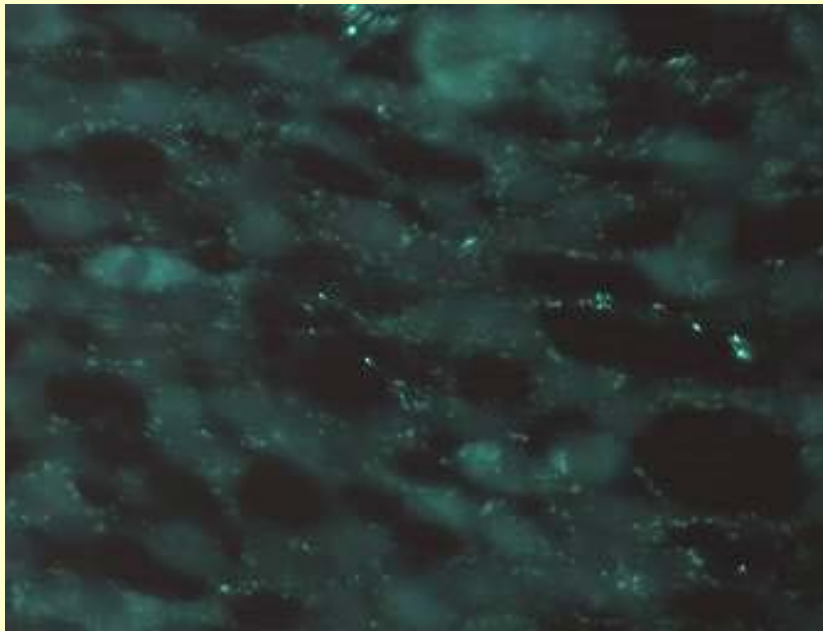
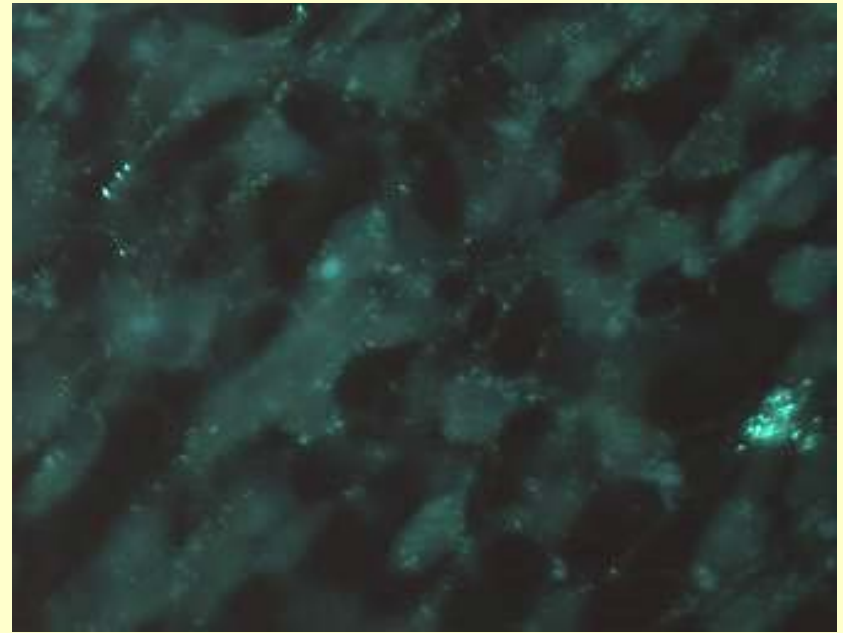
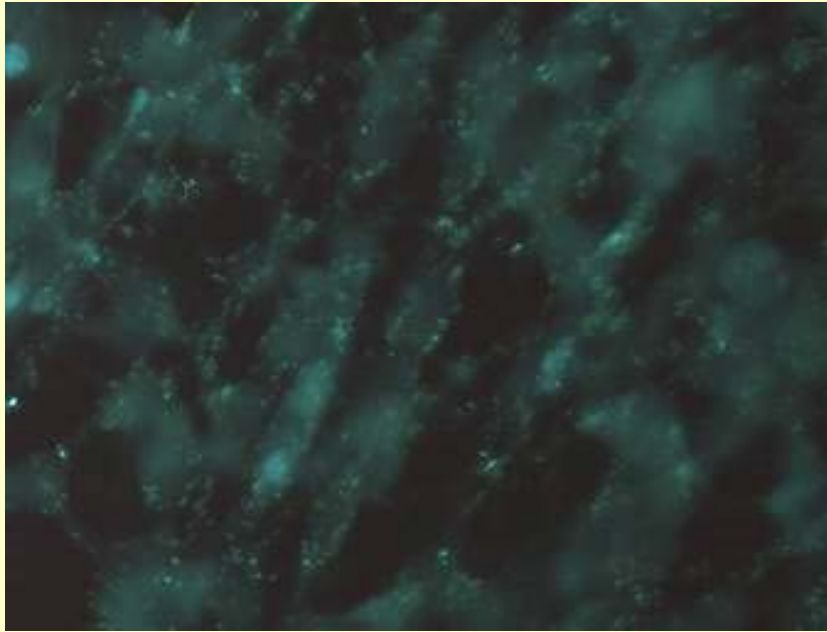
Astrocitos, control, 14 d cultivo, TSQ



Resultados Astrocitos TSQ

	partículas	desvest
Control	679.4	100.7
Etanol	126	106.7
Control No zinc	0	

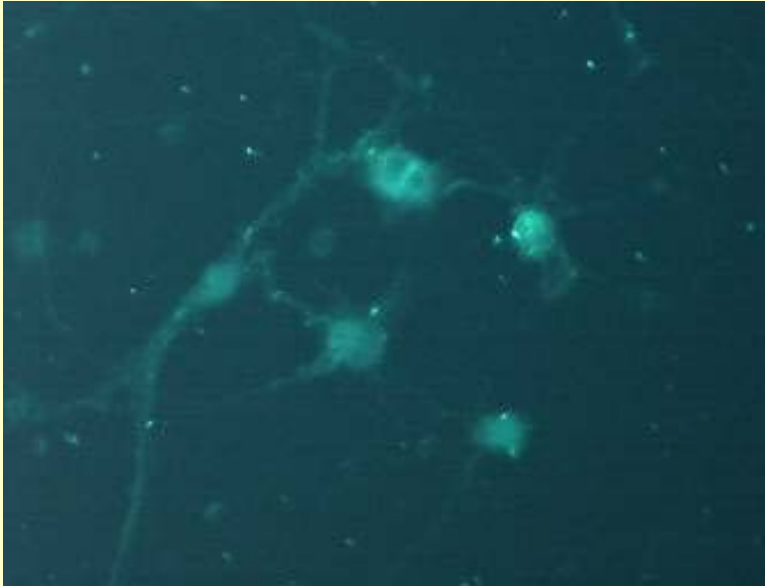
Astrocitos, Etanol, 14 d cultivo, TSQ



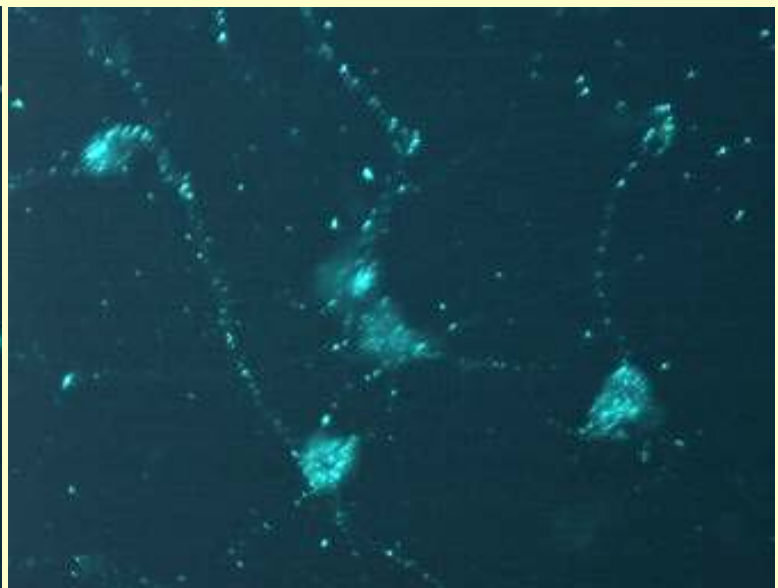
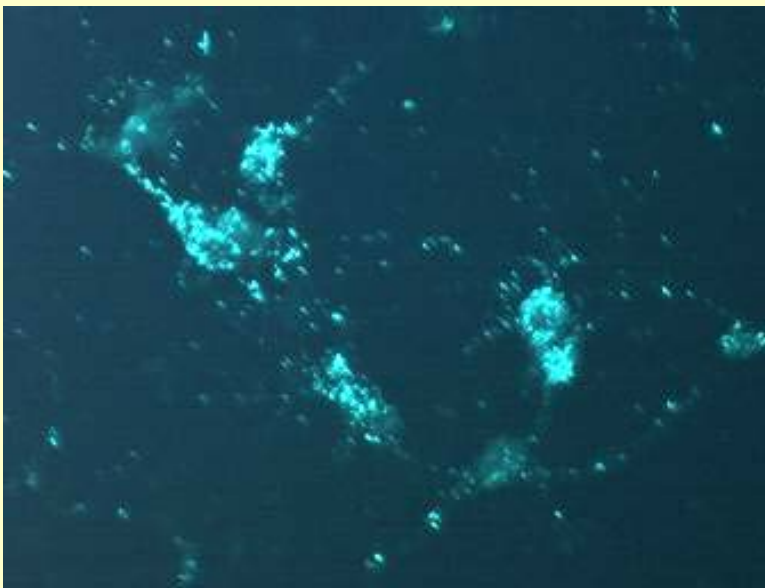
Resultados Astrocitos TSQ

	partículas	desvest
Control	679.4	100.7
Etanol	126	106.7
Control No zinc	0	

Neuronas, control, TSQ, 13 días de cultivo



Neuronas, ETANOL, TSQ, 13 días de cultivo



En la bibliografía no hay datos sobre la ultraestructura de zincosomas.

No hay evidencia morfológica (ninguna foto en microscopía electrónica) de que sean compartimentos membranosos. Ha llegado a emitirse la hipótesis (improbable) de que sean paquetes de metalotioneínas ancladas a citoesqueleto que secuestren el zinc extracelular (paquetes no membranosos)

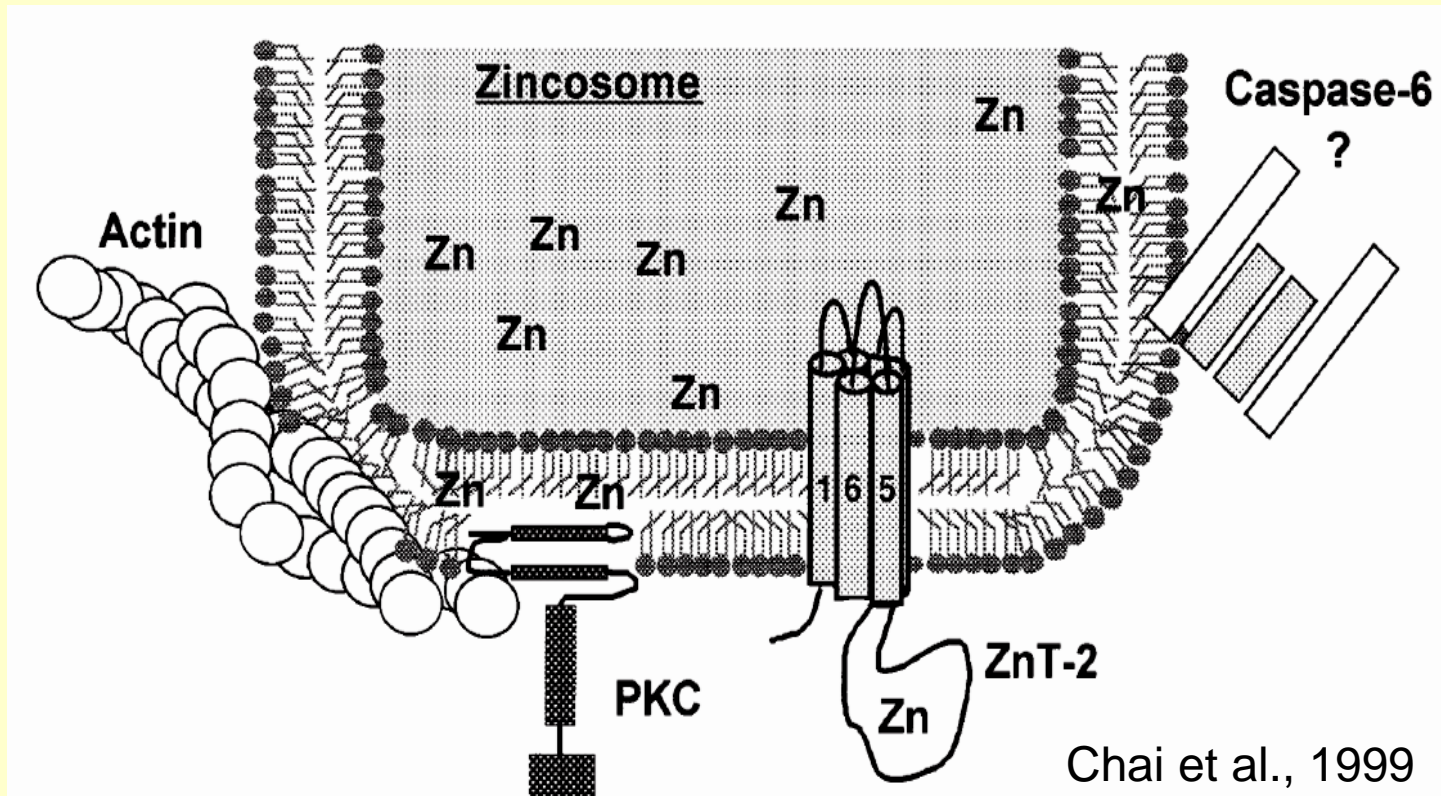
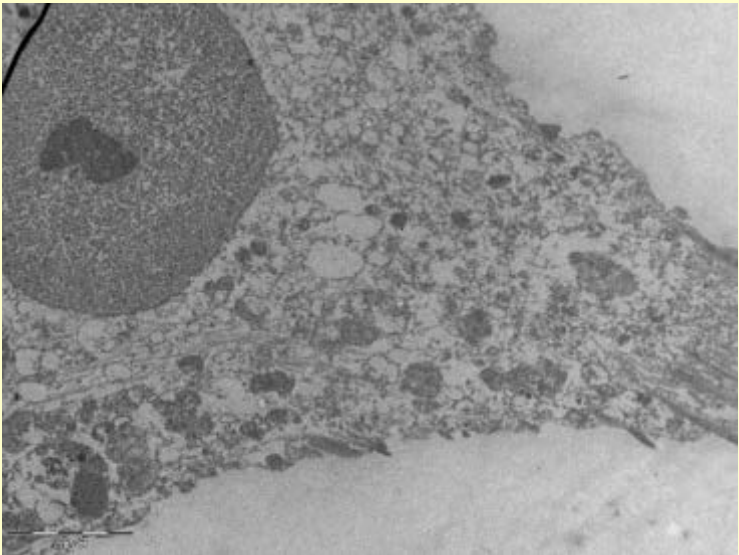
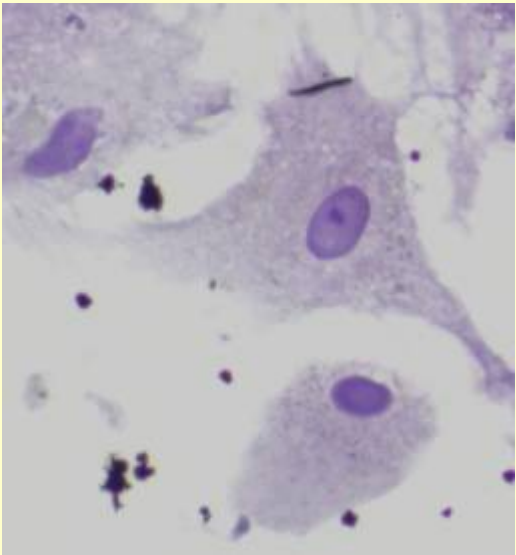
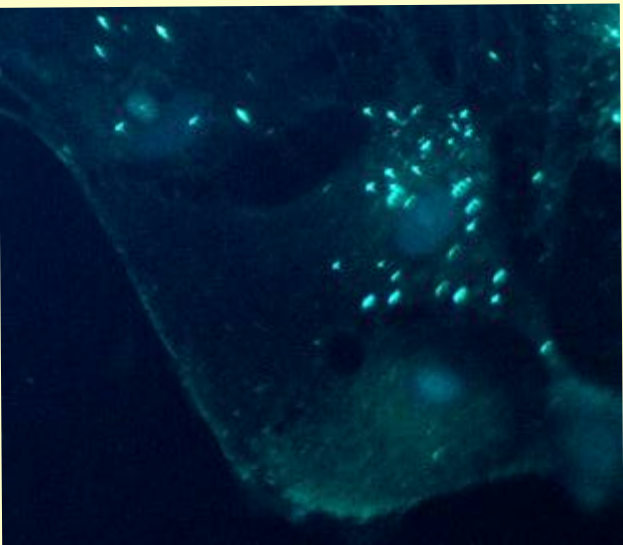
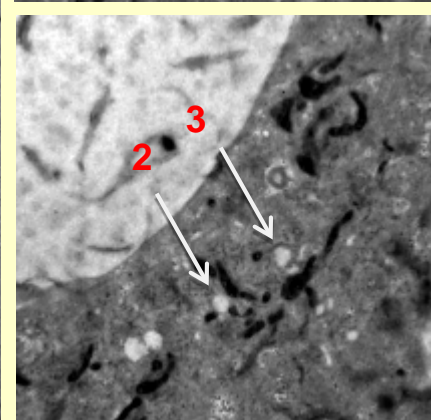
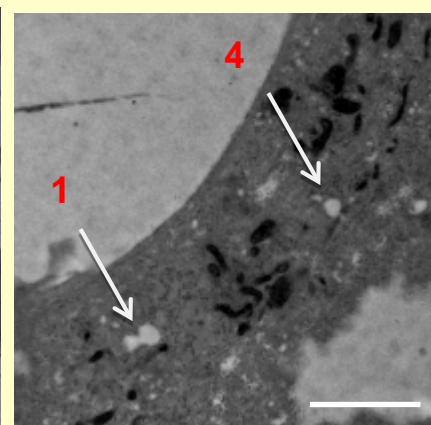
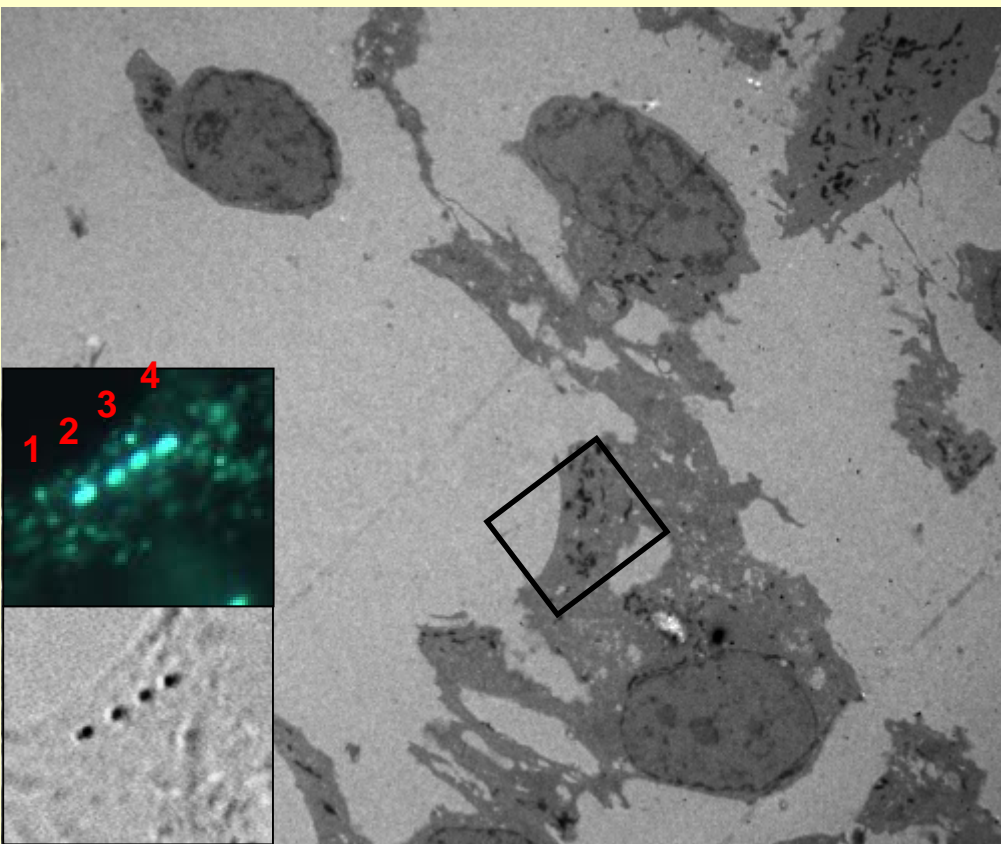
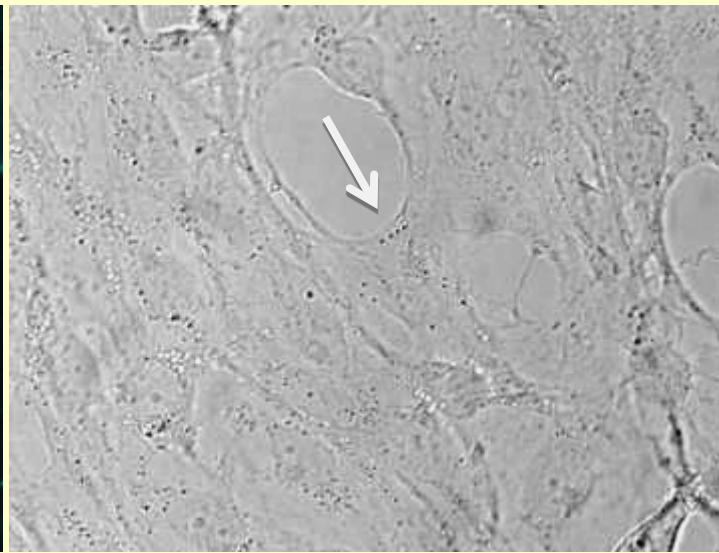
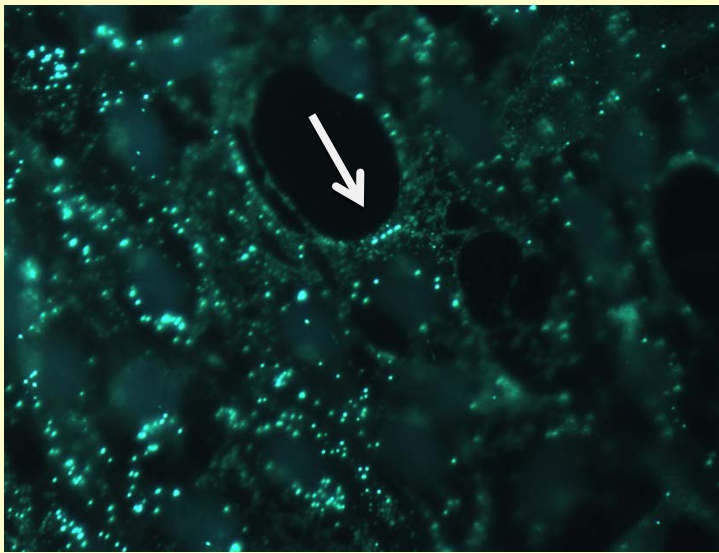


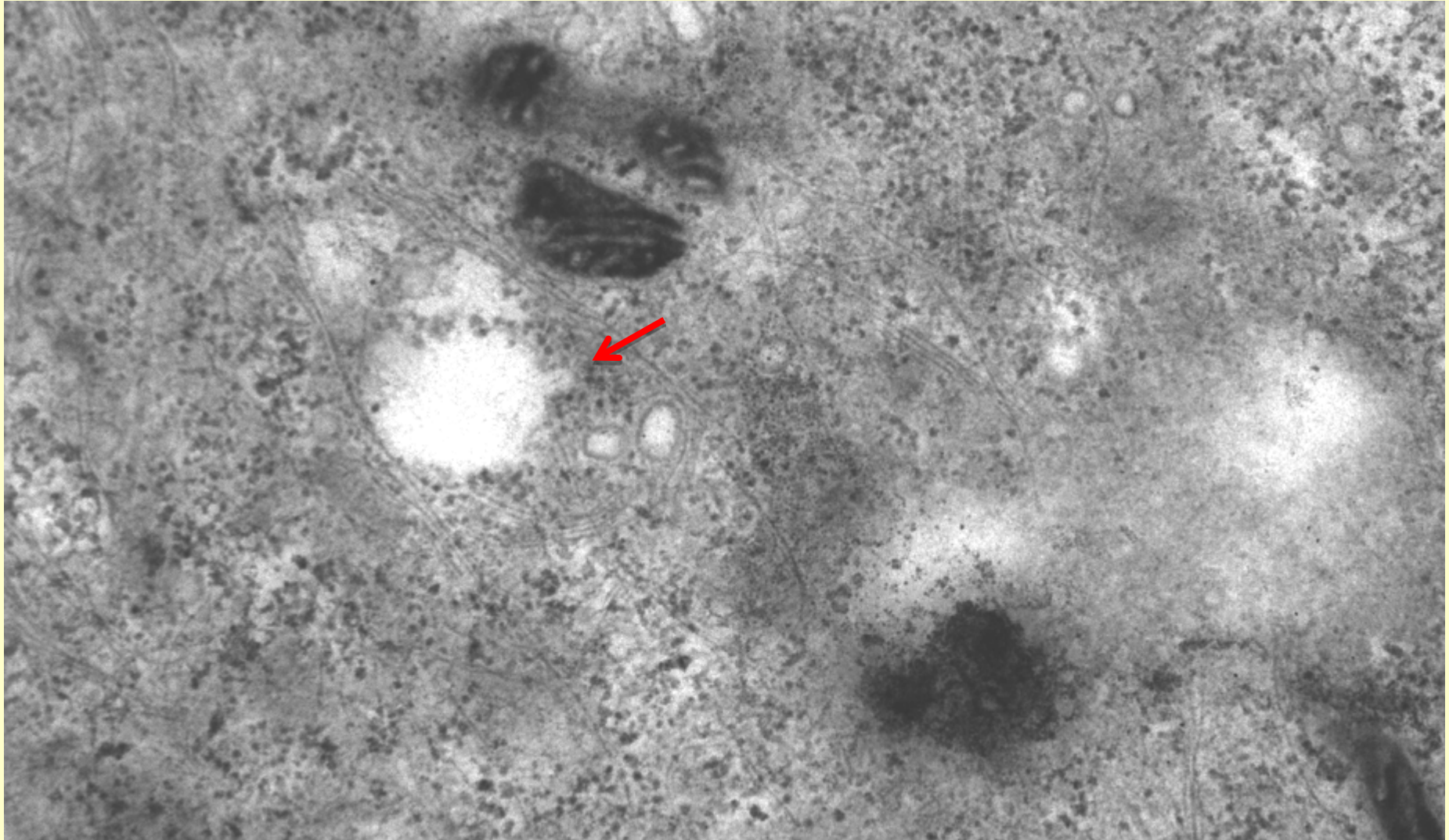
Figure 1 Model of a zincosome. The membrane is spanned by the Zn transporter molecule ZnT-2, which contains six putative membrane domains and a large histidine-rich loop, thought to be a Zn-binding site, at the cytosolic end. ZnT-2 sequesters Zn in the vesicle. Other proteins associated with the vesicle include actin and protein kinase C (PKC). The evidence that caspase-6, or other caspases, are localized to zincosomes remains speculative.

Correlacion microscopia optica - microscopia electronica





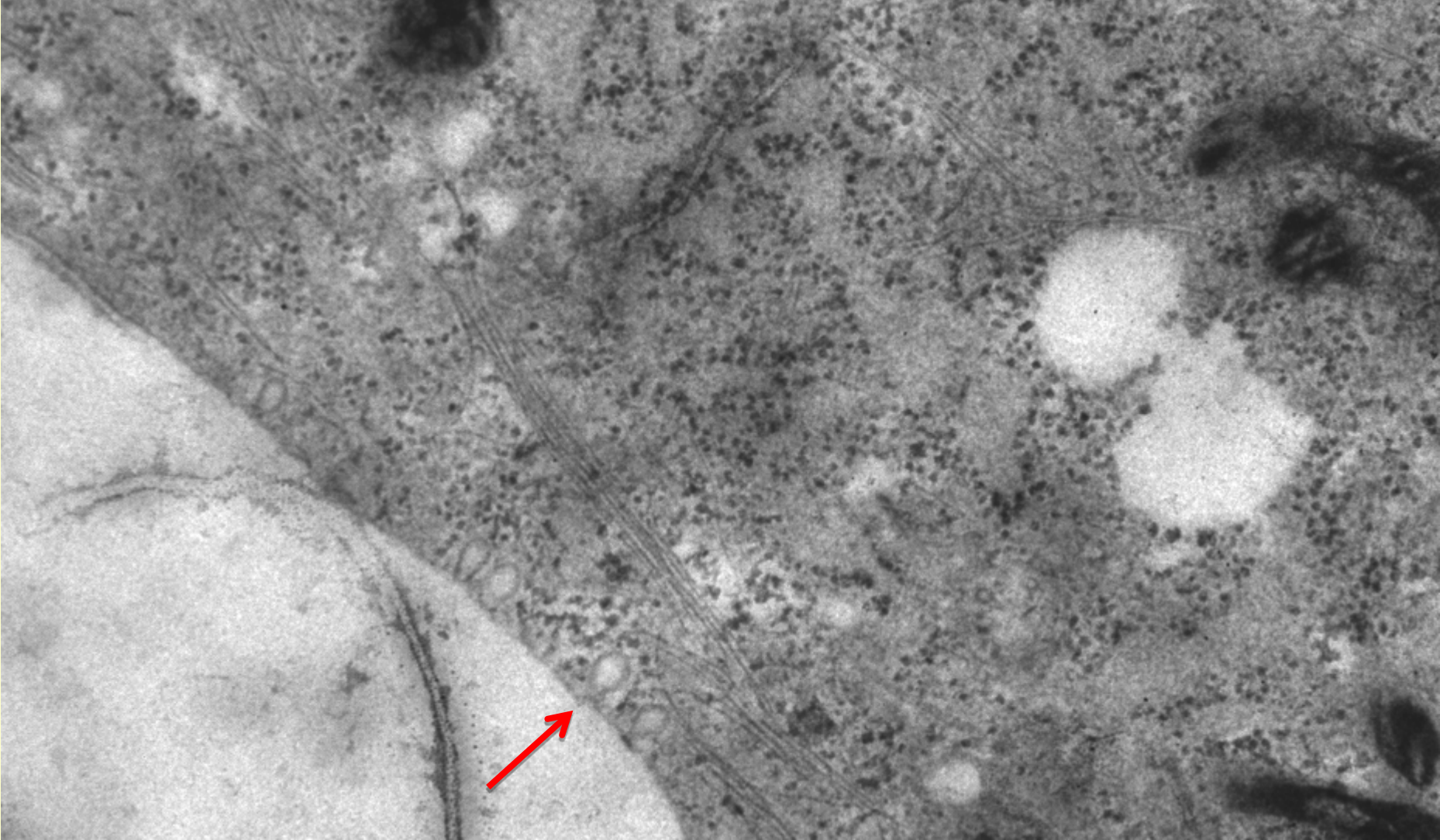
Los zincosomas están en contacto con citoesqueleto (micro- y glio-filamentos)



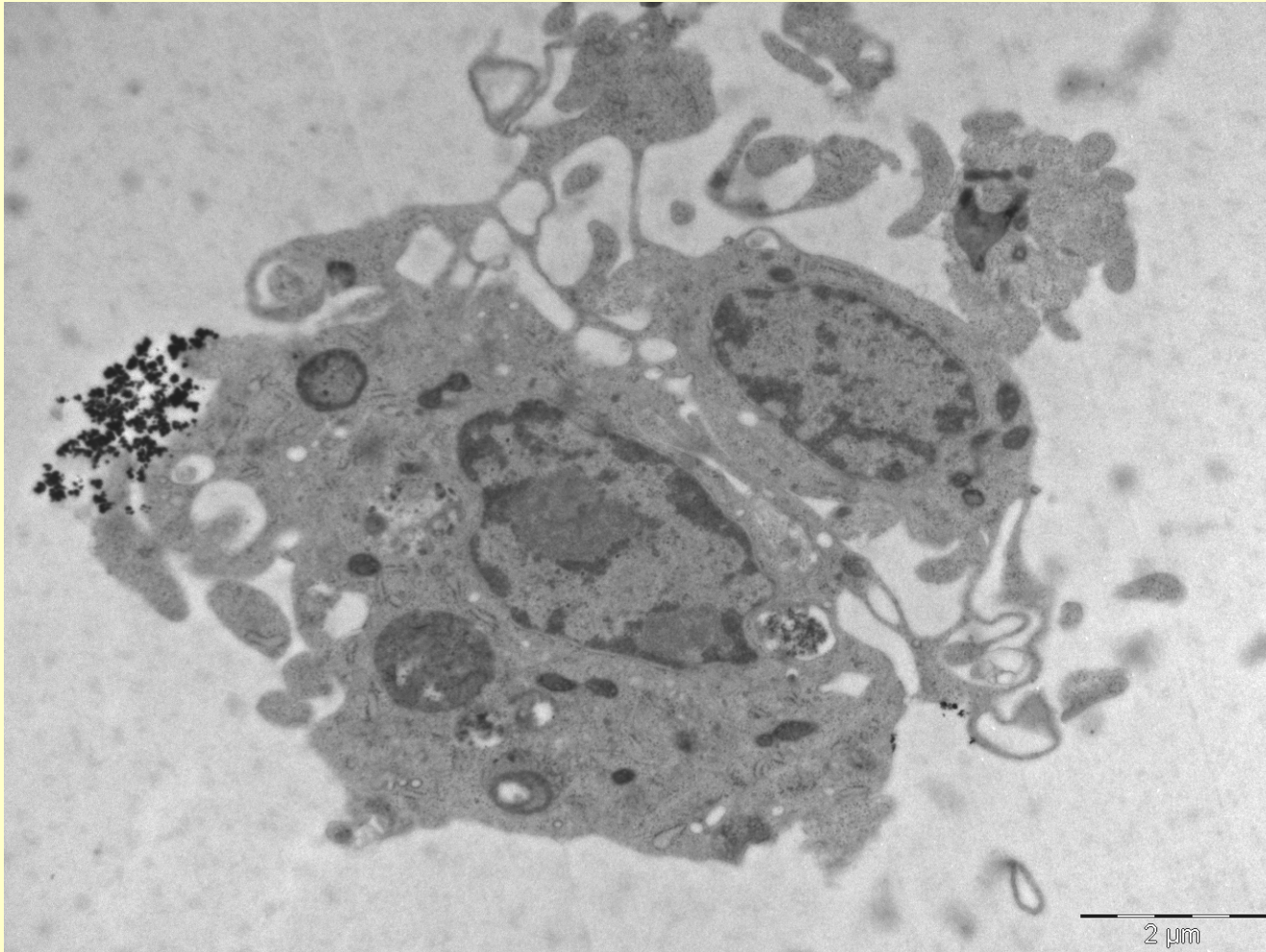
y parecen reclutar vesiculas de pino- endo-citosis, vesiculas muy frecuentes en sus cercanias



Pero su membrana es difícil de visualizar; la irradiación con ultravioleta impide una correcta visualización ultraestructural



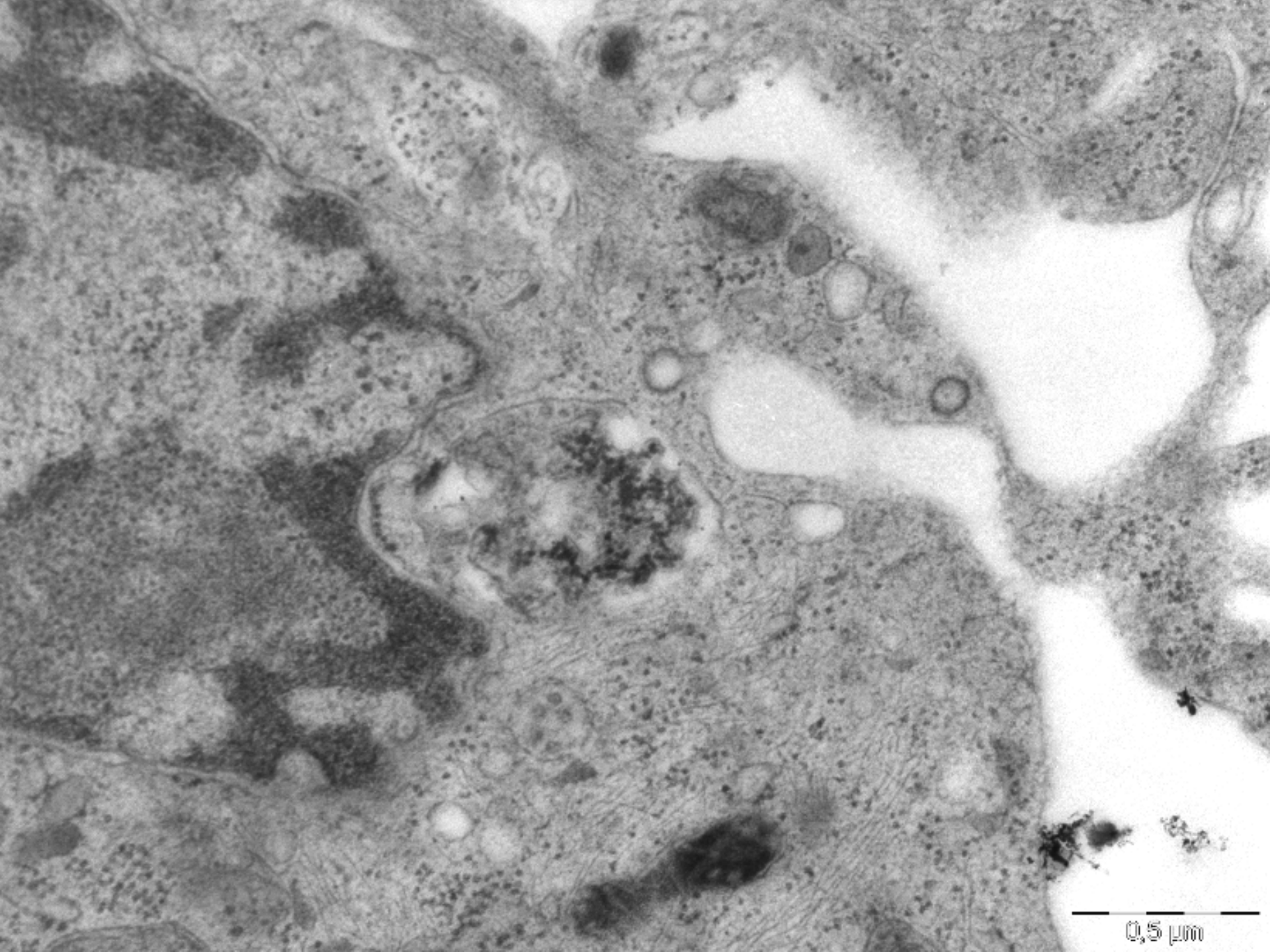
Con la tecnica sulfidrico-osmio para deteccion citoquimica del zinc ionico en celulas no irradiadas con ultravioleta pueden observarse imágenes de pino- o microfago-citosis



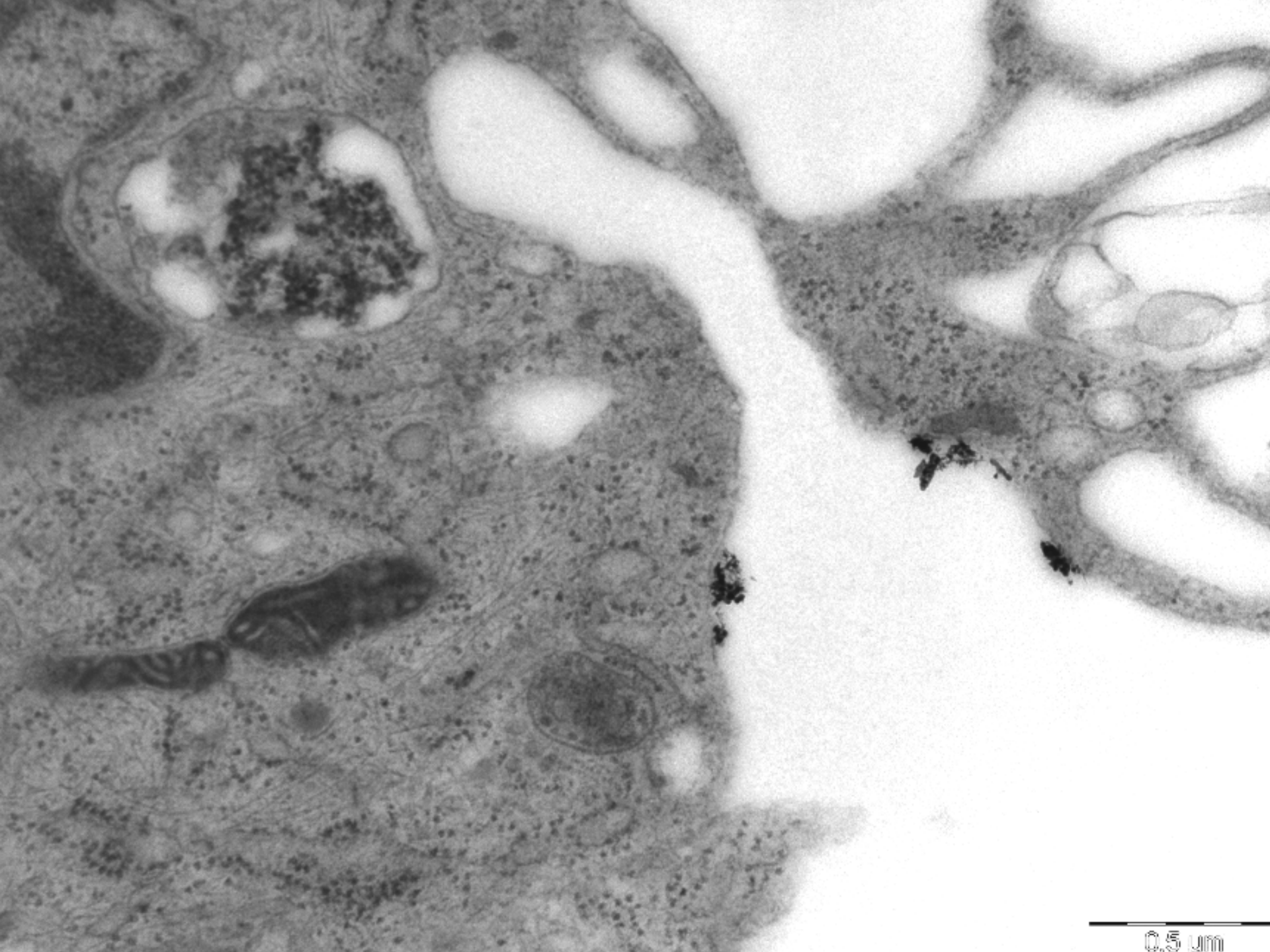
El sulfidrico precipita el zinc y el osmio lo revela electrodensos



0,5 μm

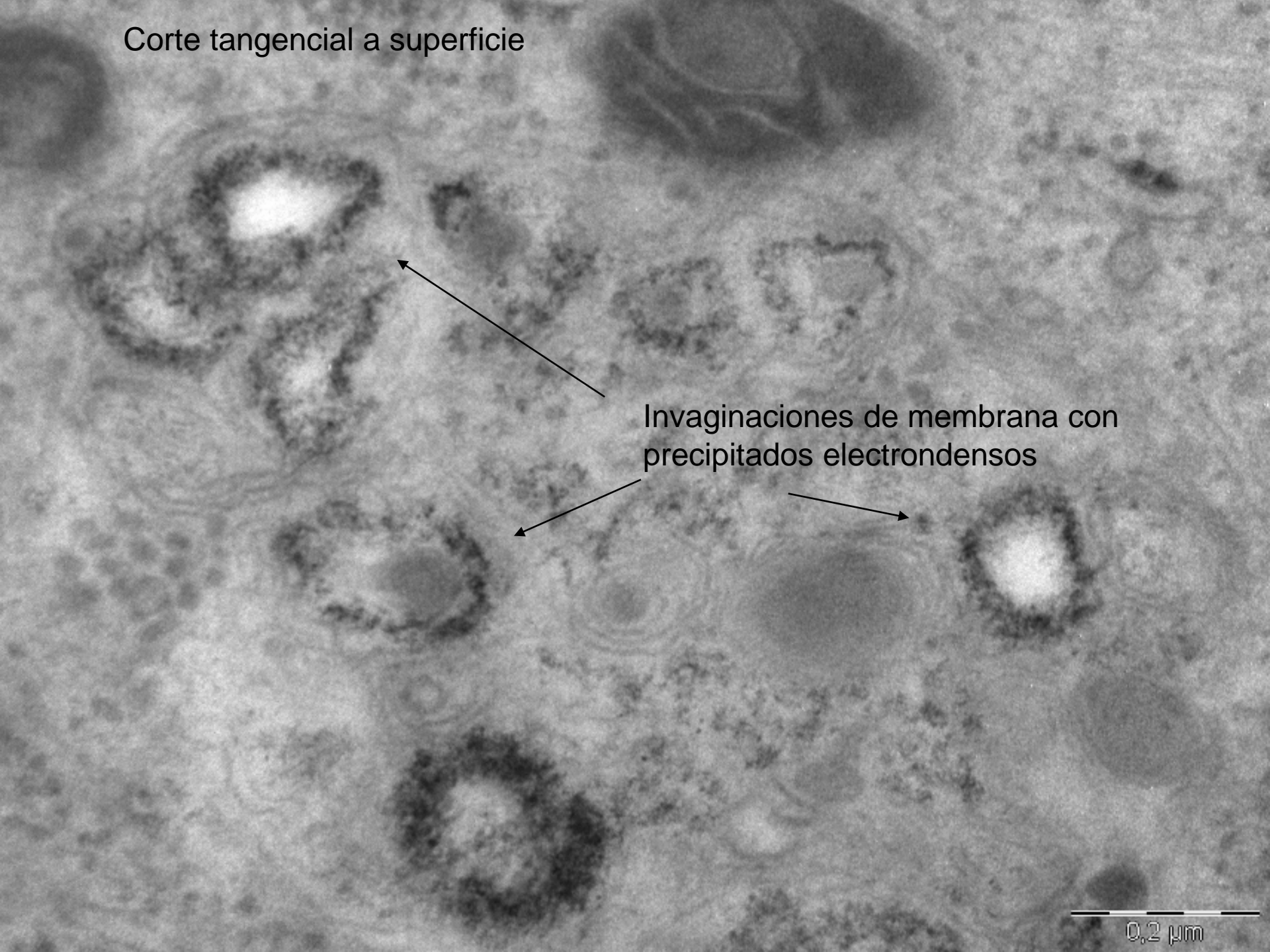


0,5 μm



0.25 μ m

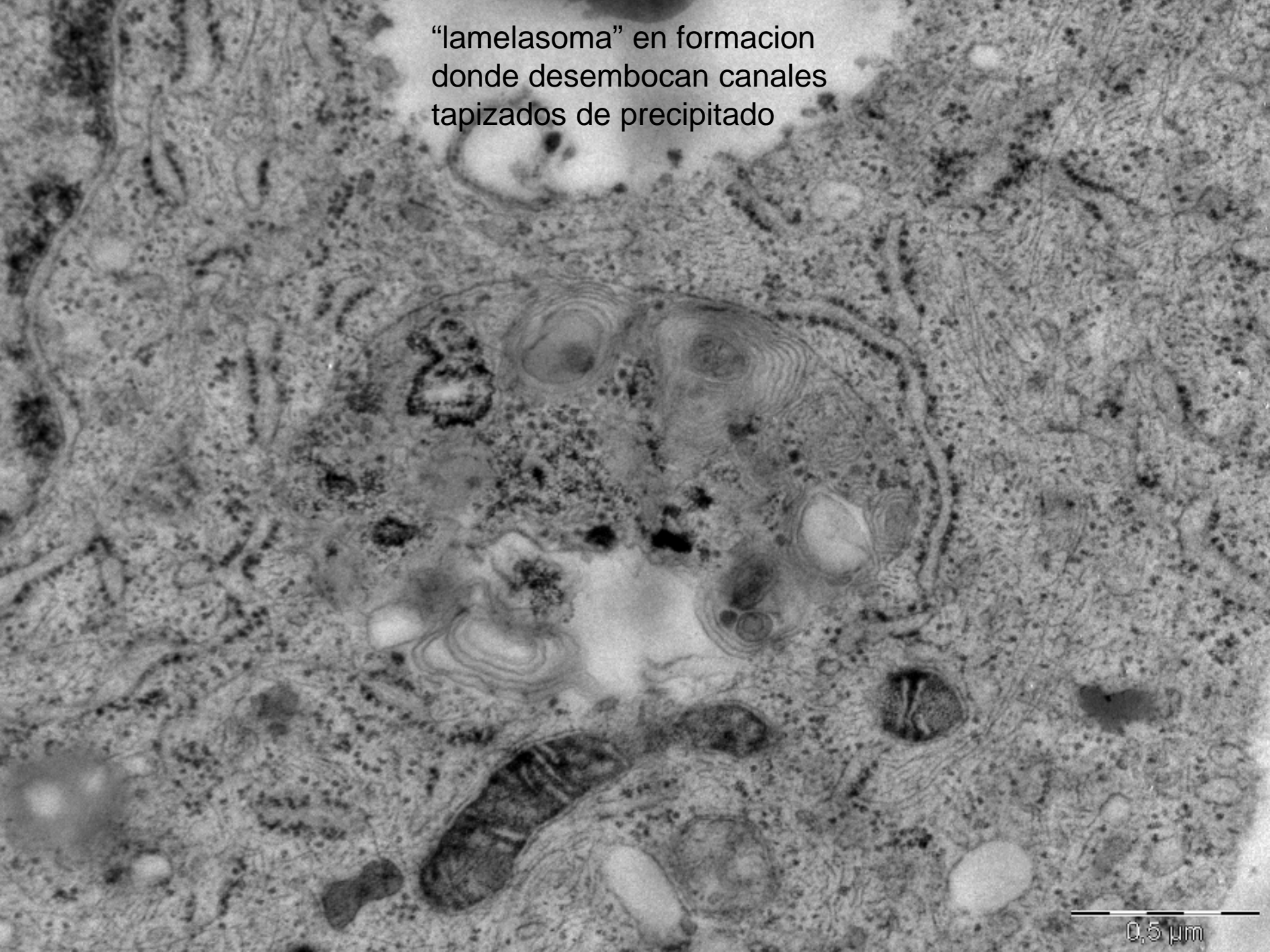
Corte tangencial a superficie



Invaginaciones de membrana con precipitados electrondensos

0,2 μm

“lamelasoma” en formacion
donde desembocan canales
tapizados de precipitado

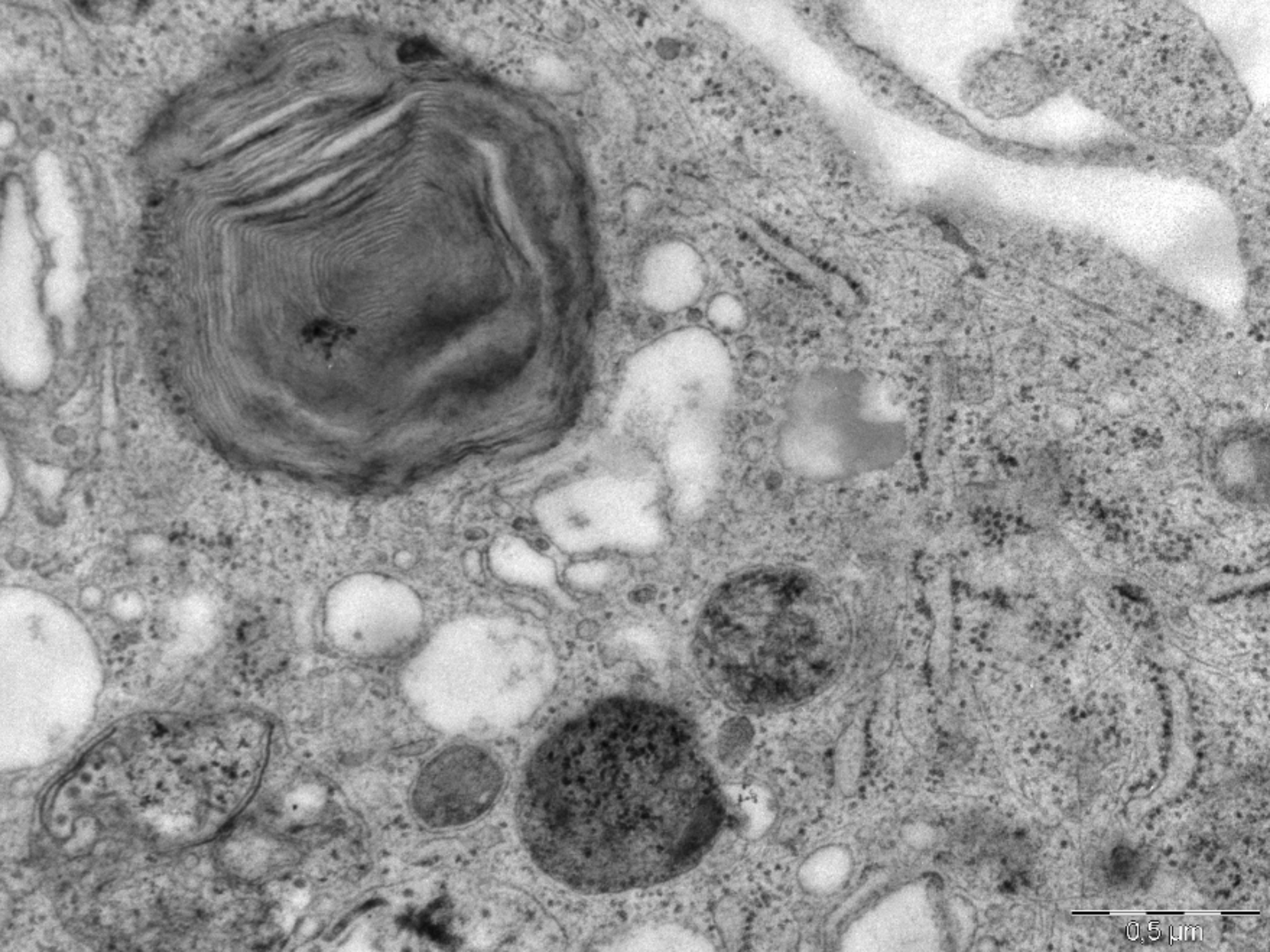


0,5 μm

“Lamelasoma” maduro



0,2 μm



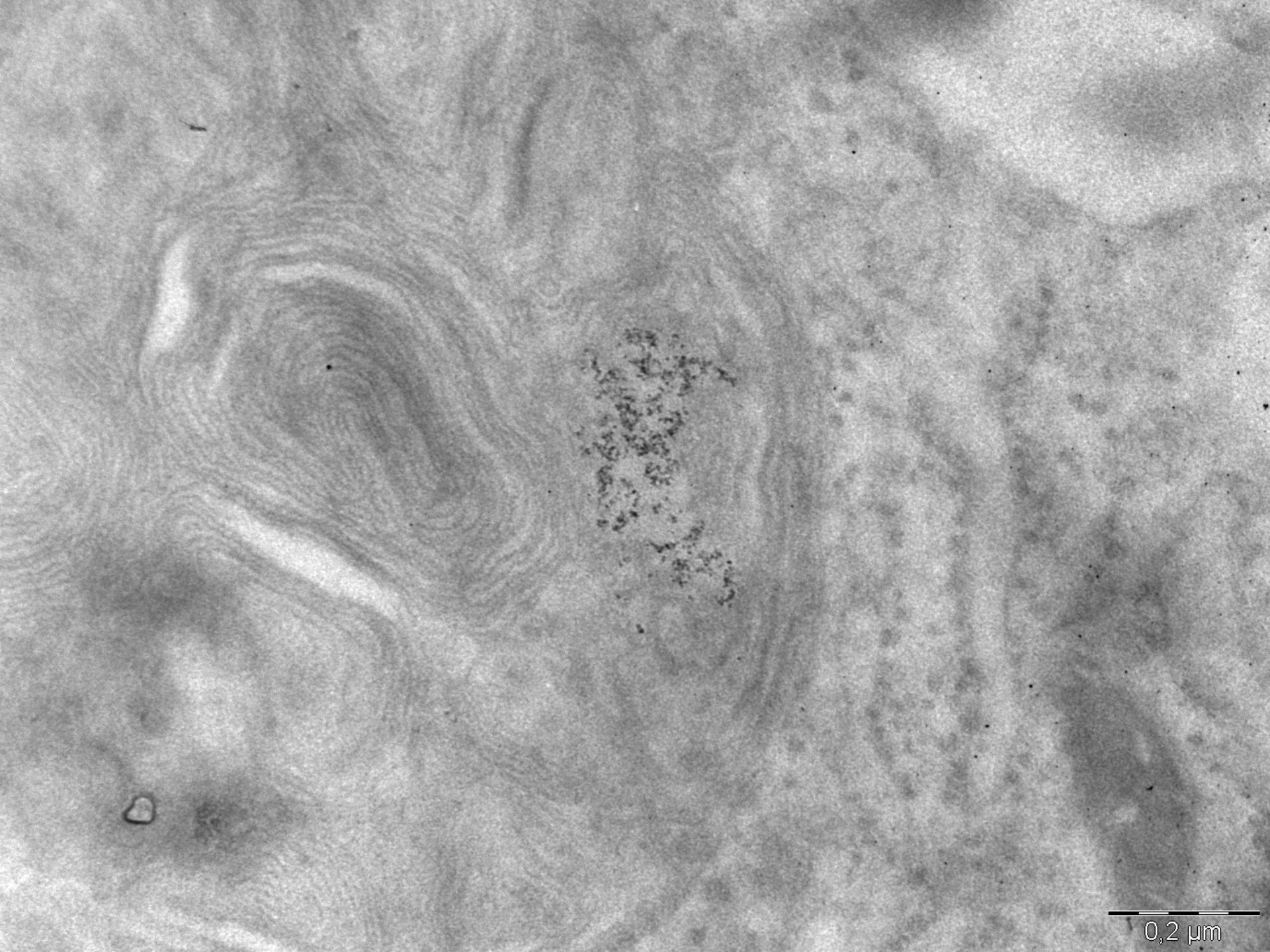
0,5 μm

Lamelasoma con precipitado electrondenso



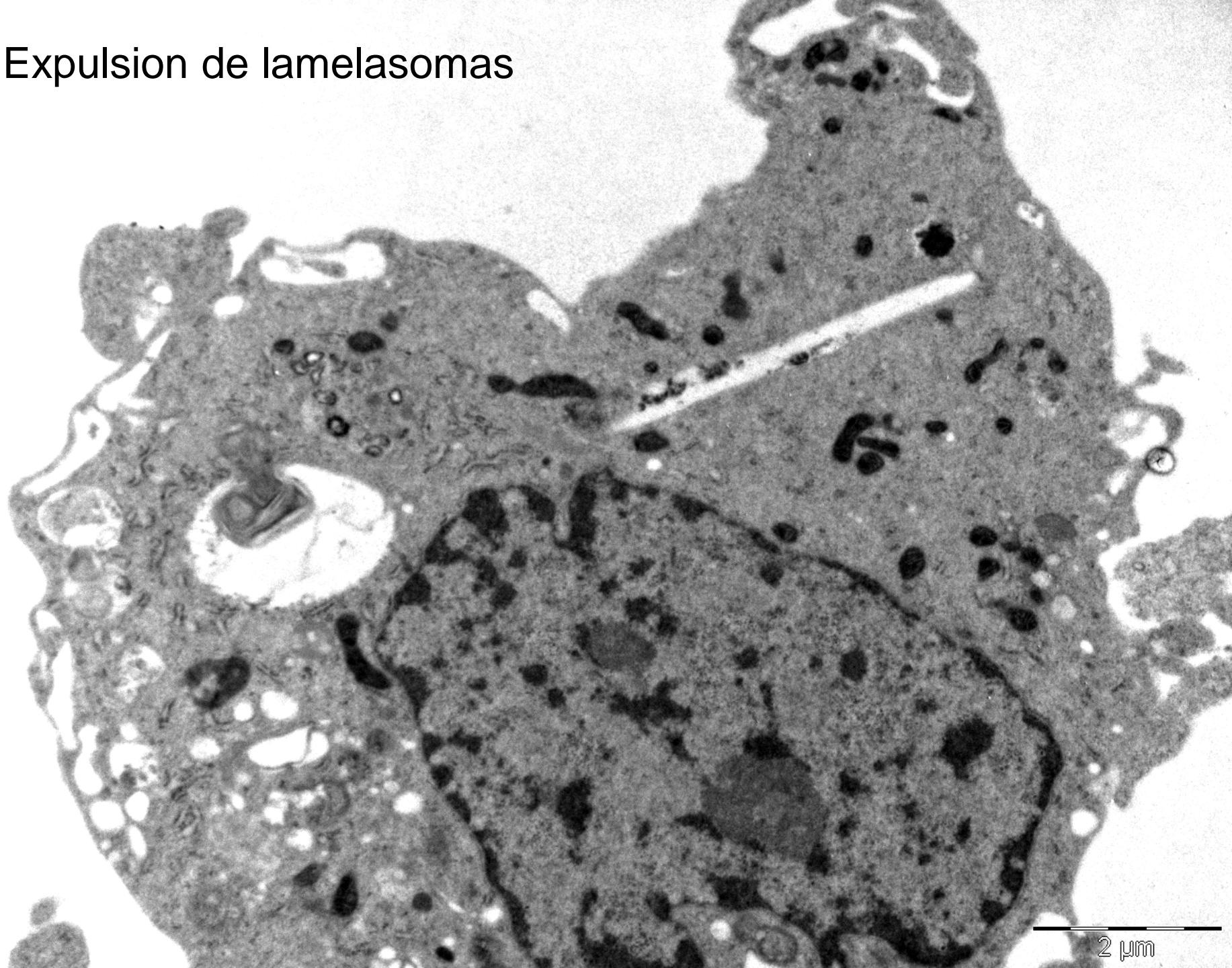
corte sin tincion con plomo

0,5 μm

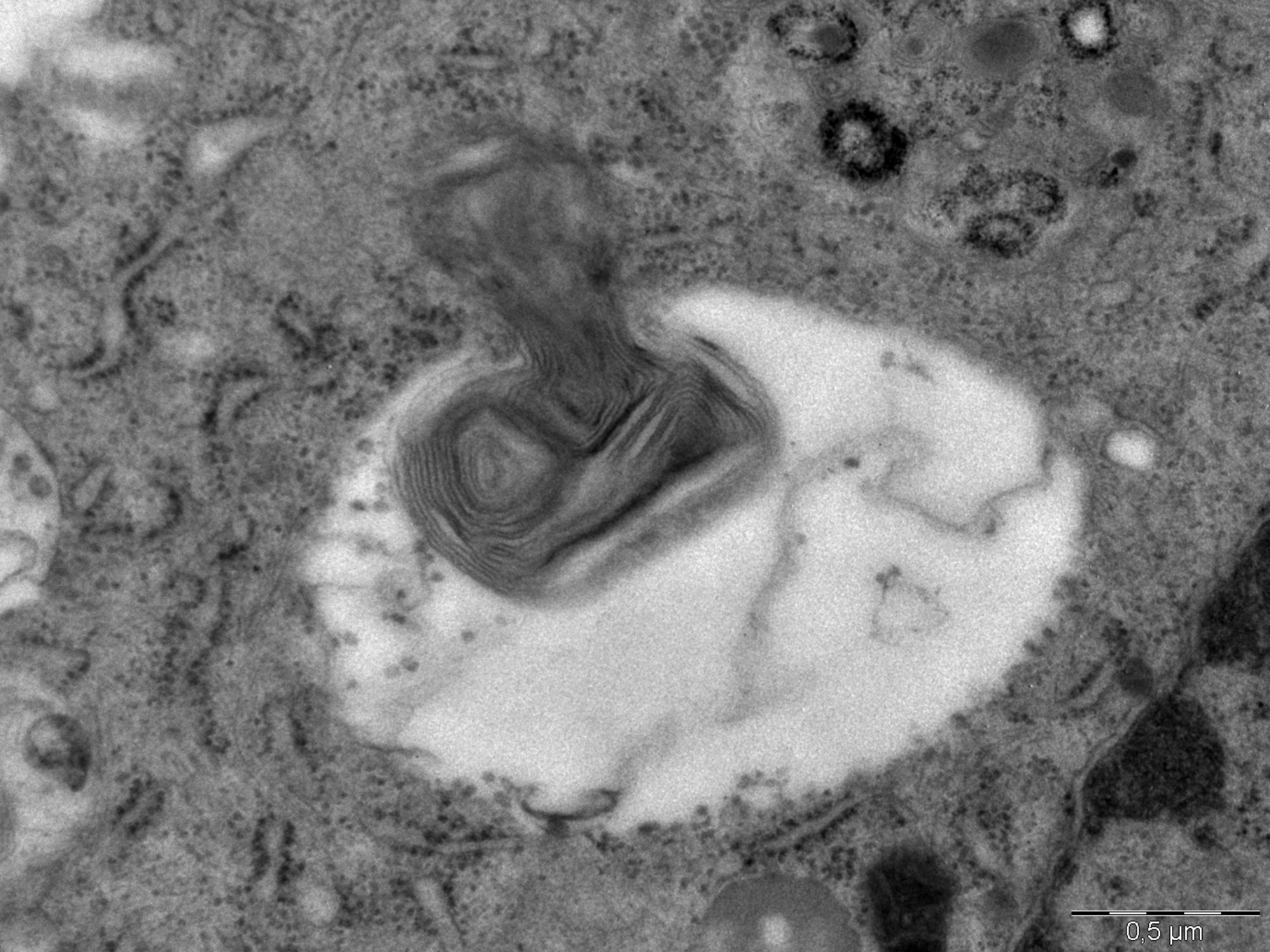


0,2 μm

Expulsion de lamelasomas

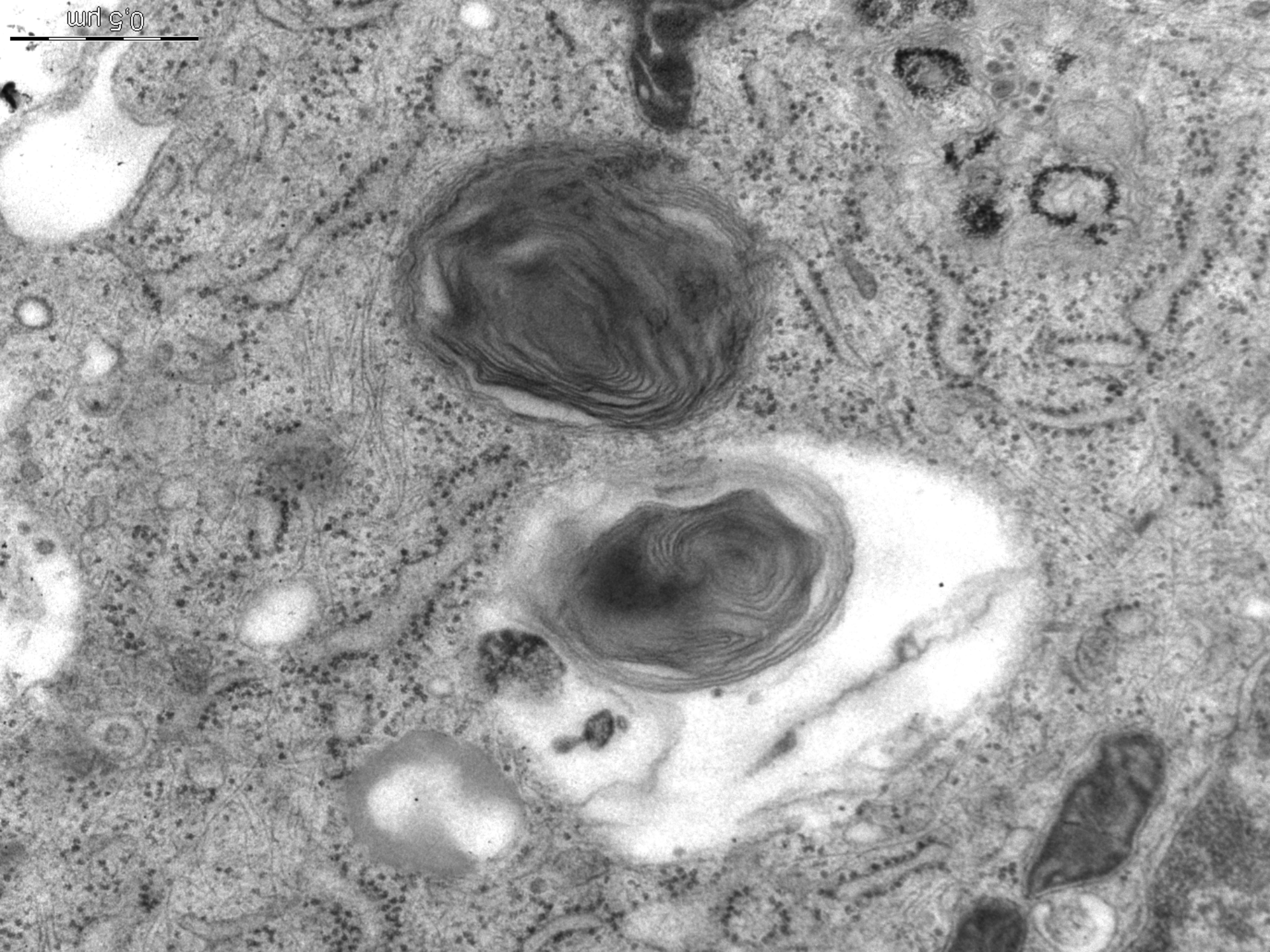


2 μ m



0,5 μm

urn 5'0



fin