



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular y Parasitología

**ASTROCITOS Y ZINC: ALTERACIONES INDUCIDAS
EN MODELOS *IN VITRO* DE LOS SÍNDROMES
ALCOHÓLICO FETAL Y DE DOWN**



TESIS DOCTORAL

RAÚL BALLESTÍN HINOJOSA

Valencia, 2015

Departamento de Biología Celular y Parasitología

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad de Valencia



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

**ASTROCITOS Y ZINC: ALTERACIONES INDUCIDAS
EN MODELOS *IN VITRO* DE LOS SÍNDROMES
ALCOHÓLICO FETAL Y DE DOWN**

**Tesis doctoral presentada por: Raúl Ballestín Hinojosa
para optar al título de Doctor por la Universidad de Valencia
Dirigida por: Xavier Ponsoda i Martí y Emilio Varea López**

Programa de Doctorado: Neurociencias Básicas y Aplicadas

Valencia, 2015

Dr. Xavier Ponsoda i Martí, Professor Titular del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de València

Dr. Emilio Varea López, Professor Titular del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de València

CERTIFIQUEN

Que D. RAÚL BALLESTÍN HINOJOSA, ha realitzat sota la nostra direcció, al Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia de la Universitat de València, el treball experimental per a l'elaboració d'aquesta memòria d'investigació destinada a la Tesi Doctoral que presenta sota el títol "ASTROCITOS Y ZINC: ALTERACIONES INDUCIDAS EN MODELOS *IN VITRO* DE LOS SÍNDROMES ALCOHÓLICO FETAL Y DE DOWN".

Per a què conste, als efectes oportuns, s'expedix la present certificació a Burjassot, 29 d'octubre de 2015.

Dr. Xavier Ponsoda i Martí

Dr. Emilio Varea López

A mis padres y a mi hermano.

A Eli.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería expresar mi agradecimiento y admiración a los Doctores Xavier Ponsoda i Martí y Emilio Varea López, por haberme brindado todo su apoyo, por dirigirme y asesorarme durante mi formación científica. Gracias por animarme y motivarme a lo largo de todo el camino, tanto en los buenos momentos como en aquellos menos favorables. Por la confianza que habéis depositado en mí y por todos los conocimientos que me habéis transmitido.

A los Profesores y compañeros Carlos López García y Asuncion Molowny Tudela, Chonchi, por sus constantes y sabios consejos, por la ayuda inestimable con el revelado autometalográfico y la microscopía electrónica, y sobre todo por las charlas tan agradables a la hora de la comida y el café de máquina.

A todos los compañeros de grupo del Centro de Investigación de La Fe, en especial al Doctor Jaime Renau Piqueras por su ayuda en los primeros momentos de mi carrera científica. A los Doctores Pilar Marín y Guillermo Esteban, por su ayuda y asesoramiento durante mi estancia en el laboratorio, y a mi compañera Ana Romero.

A todos los compañeros del Departamento de Biología Celular y Parasitología. A mis compañeros del Down, Rosa y Olga por su compañía. A mis compañeros de laboratorio Ester, Ramón, Javi, Laura, Teresa, Clara, María, Marta por su compañía y consejos. Gracias a Francisco (Kiko), Gregori y Pablo con los que di mis primeros pasos en el laboratorio del zinc.

A todos los profesores del departamento con los que he aprendido tanto, ya sea durante la carrera como durante el doctorado, Juan Nacher, José Miguel, Carlos Crespo, Quique, Martina, Paco e Isabel. A los técnicos que me han brindado su apoyo en todo momento, Sabina y Filo. Y a las secretarias que me han ayudado con todos los trámites, Pilar y M^a Carmen.

A toda la gente que no he mencionado con nombre y apellidos, pero con los que me he cruzado en el camino y de los que sin duda he aprendido algo, como compañeros de carrera y tesis, técnicos de diversos servicios y ponentes en charlas y congresos.

Finalmente mi más sentido agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres, Yvonne y Pedro, y a mi hermano Sergio, por todo el sacrificio y esfuerzo realizado, por su apoyo incondicional y confianza, así como a mi pareja Elisabet y a mi gran amigo David.

Esta tesis ha sido posible gracias a la financiación obtenida de la Universidad de Valencia, de la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe, del Ministerio de Educación y Ciencia, del Instituto de Salud Carlos III y de la fundación Jérôme Lejeune.

ABREVIATURAS

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato.

APP (*Amyloid Precursor Protein*): proteína precursora amiloidea.

ApoB (*Apolipoprotein B*): apolipoproteína B.

ARBD (*Alcohol Related Birth Defects*): defectos congénitos relacionados con el alcohol.

ARND (*Alcohol Related Neurobehavioral Disorder*): trastorno neuroconductual relacionado con el alcohol).

ATP (Adenosine Triphosphate): Adenosín Trifosfato.

CI: cociente intelectual.

CYP2E1: citocromo P450 2E1.

DCT (*Divalent Cation Transporter*): transportador de cationes divalentes.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*): medio Eagle modificado por Dulbecco.

DRAF: desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal.

FM1-43: (N-(3- trimetilamoniopropil)-4-(4-(dibutilamino)stirilo)piridinio dibromuro.

GA: glutaraldehído.

GABA: ácido γ -aminobutírico.

GAP junction: unión tipo GAP o comunicantes.

GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*): proteína fibrilar ácida glial.

GR: glía radial.

HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*): solución salina balanceada de Hank.

Hsa21: cromosoma 21 humano.

LDP (*Long-Term Depression*): depresión a largo plazo.

LTP (*Long-Term Potentiation*): potenciación a largo plazo.

MAP-2 (Microtubule-Associated Protein 2): proteína asociada a microtúbulos 2.

MET: microscopía electrónica de transmisión.

MT: metalotioneínas.

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico.

NPG: Newport Green DCF.

NTS (*Neo-Timm Solution*): solución reveladora de Neo-Timm.

P0: cero días postnatal, neonato.

pb: pares de bases.

PB (*Phosphate Buffer*): tampón fosfato.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*): tampón fosfato salino.

PBST (*Phosphate Buffered Saline Triton X-100*): tampón fosfato salino con Triton X-100 0,1%.

PFA: paraformaldehído.

p/v: relación peso/volumen.

qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*): PCR cuantitativa.

RER: retículo endoplasmático rugoso.

ROS (*Reactive Oxygen Species*): especies reactivas de oxígeno.

SAF: Síndrome Alcohólico Fetal.

SBF: suero bovino fetal.

SD: Síndrome de Down.

shARN (*small hairpin RNA*): ARN pequeño de horquilla.

siARN (*small interfering RNA*): ARN pequeño de interferencia.

SNC: sistema nervioso central.

TPEN: N,N,N',N'-tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina.

TSQ: N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-toluenosulfonamida.

U.A.F.: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

UV: luz ultravioleta.

ZIP (*Zrt-Irt like proteins (SLC39A)*): familia de transportadores que acumulan zinc en el citoplasma.

ZnT (*solute-linked carrier 30 (SLC30A)*): familia de transportadores que eliminan zinc del citoplasma.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. SÍNDROME ALCOHÓLICO FETAL Y SÍNDROME DE DOWN	3
1.1. Alcoholismo y síndrome alcohólico fetal.....	4
1.1.1 Situación actual del consumo de alcohol en España.....	4
1.1.2 El alcoholismo durante la gestación: el alcoholismo fetal.....	5
1.1.3 Desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal (DRAF).....	8
1.1.3.1 Consecuencias del DRAF.....	9
1.1.3.2 Vulnerabilidad de las diferentes zonas cerebrales a los efectos del alcohol.....	10
1.1.3.3 Posibles mecanismos implicados en la acción teratogénica del alcohol.....	10
1.1.3.4 Periodos críticos durante el desarrollo fetal.....	11
1.1.4 Síndrome alcohólico fetal (SAF).....	13
1) Deficiencias en el crecimiento pre- y postnatal.....	14
2) Alteraciones craneofaciales.....	15
3) Disfunciones del SNC en niños con SAF.....	16
1.1.4.1 Prevalencia del síndrome alcohólico fetal.....	19
1.1.4.2 Dosis umbral de alcohol.....	20
1.1.5 Efectos del alcohol en la glía.....	20
1.1.6 Teratogénesis del alcohol en modelos experimentales.....	21
1.1.6.1 Modelos <i>in vitro</i>	22
1.2. El síndrome de Down.....	23
1.2.1 Situación actual del síndrome de Down en España.....	24
1.2.2 Causas del síndrome de Down.....	28
1) Trisomía del 21.....	28
2) Translocación.....	30
3) Mosaicismo.....	31
1.2.3 Consecuencias del síndrome de Down.....	33
1) Diferencias generales.....	34
2) Diferencias craneofaciales óseas.....	34

3) Diferencias craneofaciales de los tejidos blandos.....	35
1.2.4 Diagnóstico del síndrome de Down.....	36
1.2.5 Síndrome de Down en modelos experimentales.....	38
2. EL ZINC Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	43
2.1 Localización del zinc.....	44
2.2 Funciones del zinc.....	46
2.3 La histoquímica del zinc.....	47
2.3.1 Métodos fluorescentes.....	47
2.3.2 Métodos colorimétricos.....	49
2.3.3 Autometalografía del zinc.....	49
A) Método de Neo-Timm.....	50
B) Método del Selenio.....	51
C) Método del Sulfhídrico-Osmio.....	52
2.4 La homeostasis del zinc.....	52
2.4.1 Transportadores.....	53
1) ZnT.....	53
2) ZIP.....	56
3) DCT.....	58
4) ATPasas de tipo P.....	59
2.4.2 Metalotioneínas.....	60
2.4.3 Canales iónicos.....	61
2.4.4 Astrocitos.....	62
2.5 Déficit de zinc y enfermedades.....	63
2.5.1 Zinc y SAF.....	63
2.5.2 Zinc y síndrome de Down.....	64
2.5.3 Zinc y Alzheimer.....	65
3. LOS ASTROCITOS Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	66
3.1 Ontogenia de las células astrogliales.....	70

3.2 Estructura de la astrogliá.....	73
3.3 Tipos de astrogliá.....	76
3.4 Funciones de la astrogliá.....	78
1) Desarrollo.....	78
2) Estructural.....	79
3) Vascular.....	79
4) Microambiental.....	81
5) Metabólico.....	83
6) Señalización.....	85
3.5 Los astrocitos y el zinc exógeno.....	88
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	91
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	97
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	99
2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS Y TRATAMIENTOS.....	100
2.1 Cultivo primario de astrocitos.....	100
2.2 Cultivo primario de neuronas.....	102
2.3 Tratamiento con etanol.....	103
2.4 Captación de zinc exógeno.....	103
2.5 Fijación.....	104
2.5.1 Fijadores.....	104
2.5.2 Postfijadores.....	105
3. MARCADORES DIRECTOS DE ZINC IÓNICO Y ORGÁNULOS CELULARES.....	106
3.1 Marcaje con Fluoazin-3 y Newport Green.....	106
3.2 Marcaje con TSQ.....	106
3.3 Marcaje con ditizona.....	106
3.4 Marcaje con FM1-43.....	106
3.5 Permeabilización de membrana para el zinc con el ionóforo piritionato de zinc.....	107

4. MARCADORES INDIRECTOS DE ZINC IÓNICO.....	107
4.1 Precipitación del zinc iónico.....	107
4.1.1 Precipitación con sulfuro sódico.....	107
4.1.2 Precipitación con selenito sódico.....	107
4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	108
4.2.1 Inclusión.....	108
4.2.2 Microtomía.....	109
4.2.2.1 Secciones semifinas.....	109
4.2.2.2 Secciones ultrafinas.....	109
4.3 Autometalografía del zinc.....	110
4.3.1 Autometalografía del zinc en monocapas.....	111
4.3.2 Autometalografía del zinc en cortes semifinos.....	112
4.3.3 Autometalografía del zinc en cortes ultrafinos.....	112
5 TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.....	113
6. EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO.....	114
7. SILENCIAMIENTO GÉNICO CON shARN.....	117
8. CAPTURA, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.....	120
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y OTROS PROCEDIMIENTOS.....	120
10. PRODUCTOS Y EQUIPOS.....	121
IV. RESULTADOS.....	123
1. DETECCIÓN DEL ZINC CON FLUORESCENCIA.....	125
1.1 Selección del fluorocromo para estudiar la captación de zinc en astrocitos.....	125
1.2 Formación de zincosomas con pulso de zinc exógeno.....	130
1.3 Efecto del tiempo de incubación con TSQ en la formación de zincosomas.....	131
1.4 Efecto del tiempo del pulso de zinc en la formación de zincosomas.....	134
1.5 Efecto de la concentración de zinc en la formación de zincosomas.....	137
1.6 Determinación de la tipología organular de los zincosomas.....	140

2. ESTABILIZACIÓN DEL COMPLEJO Zn-TSQ.....	143
2.1. Efecto del fijador sobre el marcaje fluorescente de los zincosomas con TSQ.....	143
2.2 Efecto del pH del fijador sobre el marcaje fluorescente de los zincosomas con TSQ....	146
2.3 Efecto del TSQ tras la fijación sobre el marcaje fluorescente de los zincosomas.....	149
3. DETECCIÓN DEL ZINC MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.....	152
3.1 Precipitación del zinc con selenito sódico.....	152
3.2 Precipitación del zinc con sulfuro sódico.....	153

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

4. ULTRAESTRUCTURA DE LOS ZINCOSOMAS.....	173
4.1 Caracterización ultraestructural de los zincosomas marcados con TSQ.....	173
4.2 Caracterización ultraestructural de los zincosomas marcados con ditizona.....	176
4.3 Detección de zinc a nivel ultraestructural.....	178
5. EFECTOS DEL MODELO DE SAF EN LA HOMEOSTASIS DEL ZINC.....	180
5.1 El contenido de zinc iónico basal y capturado en cultivos de astrocitos tratados con etanol.....	180
5.2 La densidad y distribución de zincosomas en cultivos de astrocitos tratados con etanol.....	184
5.3 La densidad de zincosomas con distintos tiempos de incubación con zinc en cultivos de astrocitos tratados con etanol.....	186

6. EFECTOS DEL MODELO DE SD EN LA HOMEOSTASIS DEL ZINC.....	192
6.1 El contenido de zinc iónico basal y capturado en cultivos de astrocitos Ts65Dn.....	192
6.2 Función endocítica y expresión de MT-3 en cultivos de astrocitos Ts65Dn.....	196
6.3 Silenciamiento génico de la proteína MT-3 en cultivos de astrocitos Ts65Dn.....	198
V. DISCUSIÓN.....	201
1. MODELOS UTILIZADOS.....	203
2. DETECCIÓN DEL ZINC.....	205
3. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS ZINCOSOMAS.....	214
4. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN DE ZINC EN MODELOS DE SAF Y SD.....	216
4.1 EFECTOS DEL MODELO DE SÍNDROME ALCOHÓLICO FETAL.....	216
4.2 EFECTOS DEL MODELO DE SÍNDROME DE DOWN.....	219
4.3 EFECTOS DE LAS METALOTIONEÍNAS EN MODELOS DE SAF Y SD.....	220
VI. CONCLUSIONES.....	223
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	227
VIII. PUBLICACIONES.....	269

I. INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME ALCOHÓLICO FETAL Y SÍNDROME DE DOWN.

En la actualidad se conocen multitud de síndromes como: el síndrome alcohólico fetal, el síndrome de Down, el síndrome de Asperger, el síndrome de Tourette, etc. Un síndrome se define como un conjunto de síntomas y signos que se presentan independientemente de una enfermedad. Y se diferencia de una enfermedad, en que ésta se define como las causas o efectos de un síntoma. Siendo entidades clínicas diferentes, los síndromes pueden causar también enfermedades.

En este estudio, nos vamos a centrar en dos síndromes, el síndrome alcohólico fetal (SAF) y el síndrome de Down (SD). Ambos síndromes se caracterizan por un conjunto de alteraciones físicas determinadas, con un grado variable de penetrancia afectando a distintos órganos, y por presentar una discapacidad cognitiva variable con cocientes intelectuales inferiores a la media.

En el caso del síndrome alcohólico fetal, sería un síndrome inducido, ya que sus síntomas se generan como consecuencia del hábito del consumo de alcohol durante la gestación o lactancia. Mientras que en el caso del síndrome de Down, sería un síndrome genético, fruto de alteraciones en los procesos de división celulares.

En los apartados 1.1 y 1.2 se explican detalladamente los síndromes alcohólico fetal y síndrome de Down respectivamente.

1.1. Alcoholismo y síndrome alcohólico fetal.

1.1.1 Situación actual del consumo de alcohol en España.

El alcohol etílico o etanol es una sustancia con alta capacidad adictiva por lo que es una de las principales drogas de abuso, estando considerada además, junto con los hipnosedantes y opioides, como depresor de la actividad funcional cerebral.

España es uno de los países donde el consumo de bebidas alcohólicas y los problemas relacionados con el mismo tienen mayor importancia. Somos uno de los principales productores y también somos uno de los primeros países consumidores.

Según la última *Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España* (2011-2012), realizada por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (Madrid, 22 de enero de 2013) el 76,6% de la población española con edades comprendidas entre 15 y 64 años ha consumido alcohol en los últimos 12 meses, superando el consumo de tabaco (40,2%), un 62,3% ha consumido alcohol en los últimos 30 días y un 10,2% lo consume diariamente. Siendo mayor el consumo entre los hombres (83,2%) que entre las mujeres (69,9%). La edad de inicio en el consumo de alcohol se sitúa en los 16,7 años de media. La prevalencia de las intoxicaciones etílicas agudas en los últimos 12 meses se muestra en la tabla 1.

Prevalencia de intoxicaciones etílicas agudas		
	Edad 15-34 años	Edad 35-64 años
Hombres	41,3	16,2
Mujeres	23,5	5,9

Tabla 1. Prevalencia de intoxicaciones etílicas agudas.

Se muestran los diferentes porcentajes de intoxicaciones etílicas agudas entre los consumidores de alcohol en los últimos 12 meses, clasificados por grupo de edad y sexo (Ministerios de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, EDADES 2013).

España ocupaba en el año 2009 el sexto lugar en el ranking de consumo mundial de alcohol con 11,7 litros/cápita. En 2013 el consumo en España se sitúa en torno a los 11,62 litros de alcohol puro per cápita, superado por Francia (13,66), Reino Unido (13,37) y Alemania (12,81). No obstante, hay que señalar, que igual que ha ocurrido en otros países del sur de Europa, el consumo de bebidas alcohólicas ha disminuido de manera notable en los últimos años, especialmente a expensas de una disminución en el consumo de vino. Así pues, en los últimos 25 años, el consumo de alcohol per cápita se ha estabilizado en torno a los 11 litros per cápita y año.

El alcohol sigue siendo la sustancia psicoactiva con el consumo más extendida entre la población española (79%). La mayor parte de los daños y costes socio-sanitarios asociados al alcohol se producen en sujetos consumidores aparentemente no dependientes. Diversos estudios señalan que un buen número de asistencias en urgencias e ingresos hospitalarios junto con los accidentes mortales de tráfico, están asociados al consumo de alcohol (Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas, Informe sobre alcohol, Febrero 2007).

El consumo de alcohol ocupa el tercer lugar entre los factores de riesgo de la carga mundial de morbilidad y el segundo en Europa. La OMS estima que anualmente 2,5 millones de personas mueren por causa del alcohol en todo el mundo; a lo que hay que añadir su relación con una gran cantidad de patologías diferentes. Éstas se desarrollan teniendo en cuenta no solo la cantidad de alcohol consumido sino también el patrón de consumo (Room *et al.*, 2005; Seitz *et al.*, 2012). Entre las distintas patologías podemos encontrar: anomalías en el desarrollo del feto, cirrosis hepática, enfermedades cardiovasculares, alteraciones renales, diabetes, cáncer bucal y esofágico, daño cerebral y epilepsia.

Los trastornos producidos por el consumo de alcohol sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), pueden dividirse en dos grupos:

- 1) Relacionados con el efecto directo del alcohol sobre el cerebro, que incluyen: intoxicación, abstinencia, delirio, psicosis, ansiedad, trastorno del sueño, etc.
- 2) Comportamiento hacia el alcohol, que puede ser de abuso o dependencia.

1.1.2 El alcoholismo durante la gestación: el alcoholismo fetal.

Actualmente se admite que el consumo de alcohol durante la gestación puede inducir graves daños en el desarrollo del feto (Climent *et al.*, 2002).

La exposición prenatal a alcohol aumenta los riesgos de sufrir alteraciones físicas, cognitivas y de comportamiento en el individuo (U.S. *Department of Health and Human Services 2008*). Diversos estudios muestran una correlación entre el consumo de alcohol durante el embarazo y el riesgo de padecer partos prematuros (Albertsen *et al.*, 2004). Actualmente, no existen estudios poblacionales en España que nos indiquen la tasa de consumo de alcohol durante el embarazo. Por lo tanto, para obtener una percepción real del hábito de consumo de alcohol durante el embarazo debemos utilizar los datos del *National Survey on Drug Use and Health (NSDUH)*. Este informe se publicó en el 2008 y se centra en la población estadounidense, la cual hasta cierto punto, es comparable con la española.

Según los datos del estudio, entre los años 2002-2007, un 11,0% de las mujeres embarazadas con edades comprendidas entre los 18 y los 44 años, admitían haber consumido alcohol durante en los últimos 30 días previos a la encuesta, en comparación con las no embarazadas 63,0% (figura 1). Entre las mujeres embarazadas que consumieron alcohol durante el embarazo, lo hicieron en mayor cantidad durante el primer trimestre (19,0%) en comparación con el segundo (7,8%) y el tercer trimestre (6,2%).

De las mujeres que habían sido madres recientemente, el 31,9% de las mujeres con hijos de menos de 3 meses habían bebido alcohol en el último mes. Esta cantidad aumenta gradualmente hasta el 50% aproximadamente en madres con hijos de hasta 1 año (figura 1).

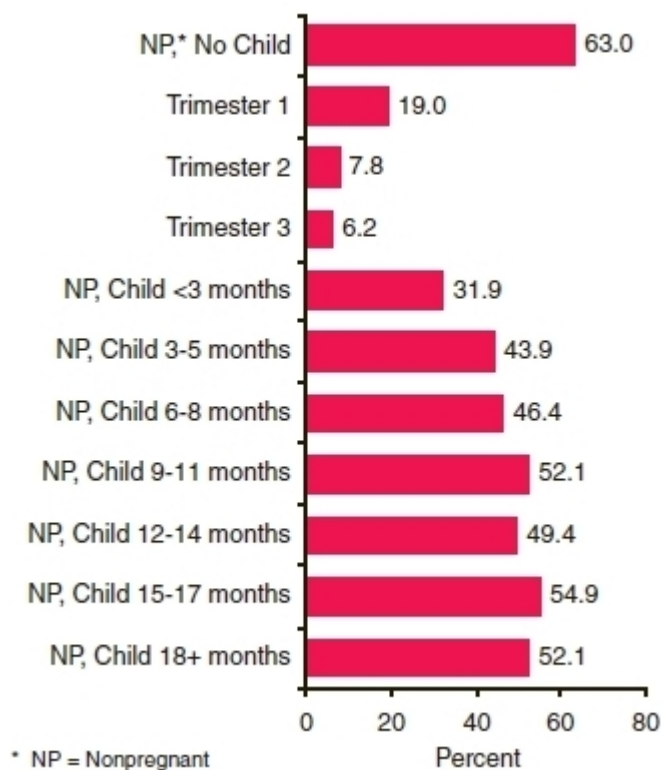


Figura 1. Porcentaje de mujeres consumidoras de alcohol durante el último mes.

El porcentaje de mujeres consumidoras de alcohol durante el embarazo va del 6,2% al 19,0%, siendo la tasa más alta durante el primer trimestre. Las mujeres con hijos recién nacidos van aumentando el consumo de alcohol desde el 31,9% hasta casi el 50% al llegar al año de edad. Las mujeres sin hijos son las que poseen la mayor tasa de consumo de alcohol (63,0%) (*National Survey on Drug Use and Health, NSDUH, 2008*).

Lamentablemente, el consumo de alcohol en mujeres embarazadas no ha variado significativamente en los últimos años, siguiendo un patrón de consumo estable, al igual que sucede con el consumo de alcohol de mujeres que han sido madres recientemente y en mujeres que ni están embarazadas ni han sido madres recientemente (figura 2) (*National Survey on Drug Use and Health, NSDUH, 2008*).

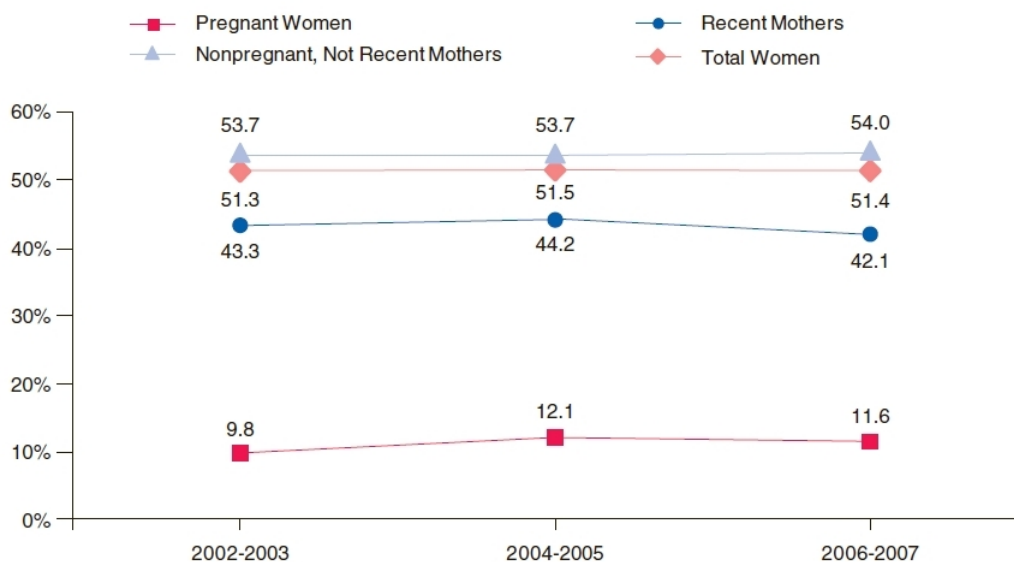


Figura 2. Comparación del porcentaje de mujeres consumidoras de alcohol.

Los consumos de alcohol se han mantenido constantes en los últimos años, para todos los grupos de mujeres analizadas durante el periodo 2002-2007 (*National Survey on Drug Use and Health, NSDUH, 2008*).

También es importante situar el consumo de alcohol en el contexto social para entenderlo mejor (figura 3). Entre las mujeres embarazadas, la franja de edad que más alcohol consumió durante el último mes era de los 15-17 años (un 15,8%). El consumo de alcohol durante el embarazo siempre se había asociado a un nivel cultural y/o perteneciente a grupos marginales. Sin embargo, se observó que las mujeres que más alcohol consumían durante el embarazo eran las que poseían estudios universitarios (15,8%) y con los ingresos económicos elevados (16,3%).

Demographic Characteristic	Pregnancy Status		
	Pregnant	Recent Mothers	Nonpregnant, Not Recent Mothers
Age			
15 to 17	15.8	26.8	25.3
18 to 25	9.8	41.2	62.2
26 to 44	12.5	42.9	55.7
Education Status***			
Less Than High School	8.9	28.1	37.7
High School Graduate	8.3	35.7	51.8
Some College	11.7	45.6	60.9
College Graduate	15.8	53.7	69.7
Income			
Less Than \$20,000	11.7	30.9	47.3
\$20,000 to \$49,999	9.2	38.3	50.7
\$50,000 to \$74,999	9.5	47.1	55.2
\$75,000 or Higher	16.3	54.4	62.2

Figura 3. Porcentaje del consumo de alcohol en el contexto social.

Se analizó el consumo de alcohol en distintos momentos de la maternidad y su relación con la edad, nivel educativo y económico. Los mayores porcentajes de consumo de alcohol en mujeres embarazadas se sitúan: a) por franja de edad, entre 15-17 años, el grupo más joven; b) por nivel educativo, en el grupo con mayores estudios; y c) por nivel económico, en el grupo con mayores ingresos (*National Survey on Drug Use and Health, NSDUH, 2008*).

En España, solamente se disponen de datos poblacionales aislados que estiman que entorno a un 25% de las mujeres embarazadas siguen consumiendo alcohol durante el embarazo (Anderson y Baumberg, 2006), y además son consumidoras de riesgo, pudiendo llegar a ingerir dosis altas de alcohol (Rubio y Santo-Domingo, 2000).

En definitiva, el índice de consumo de alcohol en mujeres embarazadas obtenido mediante estudios poblacionales es de gran ayuda ya que muestran el alcance del problema e identifica a los grupos de riesgo, lo cual permite desarrollar y diseñar políticas de prevención y educación.

1.1.3 Desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal (DRAF).

El alcohol aún a dosis bajas, y especialmente consumido durante el primer trimestre del embarazo, aumenta el riesgo de padecer abortos espontáneos, partos prematuros, retraso en el crecimiento intrauterino, bajo peso del feto al nacer (Abel, 1997; Windham *et al.*, 1997; Bradley *et al.*, 1998; Albertsen *et al.*, 2004), y una reducción en la producción de leche materna (Mennella, 2001). El alcohol como agente teratogénico, afecta al desarrollo embrionario o fetal, alterando la expresión génica, induciendo muerte celular programada (Guerra *et al.*, 2009), perturbando la proliferación y migración celular (Goodlett *et al.*, 2005), la histogénesis, y

modificando la síntesis y/o función de proteínas o ácidos nucleicos (Polifka y Friedman, 2002). La exposición prenatal a alcohol es causa destacada y prevenible de anomalías en el desarrollo del cerebro, como retraso mental y desórdenes en el desarrollo neuronal (*FAS and ARND*, *American Academy of Pediatrics*, 2000). El alcohol atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria, por lo que cualquier cantidad del mismo que sea ingerida durante el embarazo, supone un riesgo para el feto, siendo potencialmente mayor a cantidades más elevadas. La consecuencia más conocida es el *Síndrome Alcohólico Fetal* (SAF; Jones y Smith, 1973), caracterizado por deficiencias pre y postnatales en el crecimiento, anomalías craneales y faciales, y evidencias de disfunciones en el sistema nervioso central (SNC). Actualmente, el SAF es considerado una de las causas más importantes de discapacidad intelectual y problemas en el comportamiento en diversos países (Streissguth *et al.*, 1991; Alati *et al.*, 2006; Autti-Rämö *et al.*, 2006; Ceccanti *et al.*, 2007; Spohr *et al.*, 2007). Sin embargo, durante los últimos 30 años, se ha observado que el SAF no es la única consecuencia resultante de la exposición prenatal a alcohol y que sus efectos son un conjunto de anomalías físicas y deficiencias cognitivas. El término *Desórdenes Relacionados con el Alcoholismo Fetal* (DRAF) del inglés *Fetal Alcohol Spectrum Disorders* (FASD), engloba todo este conjunto de efectos variables y no diagnosticables de forma evidente (Barr y Streissguth, 2001).

1.1.3.1 Consecuencias del DRAF.

La exposición prenatal a alcohol está asociada con déficits neuropsicológicos que repercuten en la inteligencia, la memoria, el aprendizaje (Howell *et al.*, 2006), las habilidades óptico-espaciales (Mattson *et al.*, 1996), funciones ejecutoras, las habilidades motoras y la adaptación social (Mattson y Riley, 1998). Todo ello sugiere la existencia de anormalidades en la ruta frontal-subcortical y un mayor daño en el lóbulo izquierdo (Guerra *et al.*, 2009). De hecho, la exposición a alcohol provoca alteraciones en la remodelación axonal y en la incorporación de neuronas al giro dentado, ambos procesos involucrados en el aprendizaje y la memoria (He *et al.*, 2005). La falta de atención es muy frecuente en esos individuos, siendo los Trastornos por Déficit de Atención con Hiperactividad, la patología psiquiátrica más diagnosticada en individuos DRAF (Fryer *et al.*, 2007). Finalmente, varios estudios describen deficiencias en la función ejecutora en individuos con DRAF que implica problemas en la inhibición de respuesta, planificación, formación de conceptos, vulnerabilidad frente a las adversidades, y fluidez del lenguaje verbal y no verbal (Kodituwakku *et al.*, 1995; Mattson *et al.*, 1999; Lupton *et al.*, 2004).

Se estima que entre un 1-3% de todos los niños del mundo sufren DRAF (Sampson *et al.*, 1997; May y Gossage, 2001).

1.1.3.2 Vulnerabilidad de las diferentes zonas cerebrales a los efectos del alcohol.

Los efectos del alcohol en el desarrollo cerebral no son uniformes e incluso ciertas poblaciones celulares son más vulnerables que otras. Datos clínicos y experimentales indican que los individuos afectados por la exposición fetal a alcohol padecen una reducción del tamaño cerebral (Johnson *et al.*, 1996). Concretamente, se describen disminuciones de volumen en el lóbulo parietal (Archibald *et al.*, 2001), partes del lóbulo frontal (Sowell *et al.*, 2002) y en el cerebelo (Sowell *et al.*, 1996; Autti-Rämö *et al.*, 2002; O'Hare *et al.*, 2005), así como alteraciones en el cuerpo calloso, lo cual se ha asociado a déficits neuropsicológicos (Sowell *et al.*, 2001; Bookstein *et al.*, 2002; Coles *et al.*, 2002). Dado que el cerebelo es el responsable de la ejecución motora (postura, equilibrio y coordinación), estas alteraciones estructurales podrían explicar las deficiencias motoras observadas en individuos DRAF (Roebuck *et al.*, 1998). El cerebelo también está implicado en la regulación de la atención y la respuesta condicionada, tareas que se ven alteradas en individuos DRAF (Coffin *et al.*, 2005). Otra zona que ve disminuida su volumen es la de los ganglios basales, concretamente el núcleo caudado (Archibald *et al.*, 2001), el cual se ha relacionado con déficits en la ejecución de acciones, atención e inhibición de respuesta (Mattson *et al.*, 1996). Por otro lado, en las regiones corticales se ha observado que los individuos DRAF tienen una distribución y densidades diferentes de las sustancias blanca y gris (Archibald *et al.*, 2001), lo que guarda relación con la reducción de volumen de la región parietal (Sowell *et al.*, 2002). Todas estas alteraciones estructurales tienen consecuencias funcionales y metabólicas en el cerebro. Así se ha descrito en individuos con DRAF una reducción en el metabolismo de la glucosa en el tálamo (Clark *et al.*, 2000), alteraciones del flujo sanguíneo cerebral (Riikonen *et al.*, 1999; Bhatara *et al.*, 2002) y en las vías corticales serotoninérgicas y estriatales dopaminérgicas (Riikonen *et al.*, 2005). Además, mostraban una descompensación de actividad, incrementada en las regiones inferior y media de la corteza frontal (Malisza *et al.*, 2005) y disminuida en el núcleo caudado (Fryer *et al.*, 2007).

1.1.3.3 Posibles mecanismos implicados en la acción teratogénica del alcohol.

A pesar de la simplicidad química del alcohol, hoy en día no están todavía claros los mecanismos por los que esta sustancia ejerce su acción teratogénica sobre el SNC y otros órganos. Se han postulado diferentes hipótesis que confirman que el alcohol tiene múltiples dianas, por lo que no es sorprendente que dañe al feto a través de distintos mecanismos (Goodlett y Horn, 2001; Guerri *et al.*, 2001; Goodlett *et al.*, 2005; Martínez y Egea, 2007).

Determinar los lugares de acción responsables de la teratogénesis del alcohol requiere del estudio de las cascadas de señalización implicadas en el desarrollo del cerebro. Un creciente

número de mecanismos han sido identificados como potenciales responsables del fenotipo de los individuos con DRAF, los cuales se pueden agrupar en las siguientes categorías que se enumeran a continuación:

- 1.- Alteraciones en la regulación de la expresión génica: disminución de la señalización del ácido retinoico y efectos en otros factores de transcripción (Deltour *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2004).
- 2.- Interferencia con la señalización de factores de crecimiento u otras rutas de señalización: alteraciones en la proliferación, migración y diferenciación de células madre neurales (Luo y Miller, 1996; Bonthius *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2004).
- 3.- Daño y muerte celular: por inducción de la apoptosis (Young *et al.*, 2005), por estrés oxidativo (Henderson *et al.*, 1999) generando especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan la función mitocondrial; y excitotoxicidad glutamatérgica inducida por la abstinencia a alcohol (Thomas *et al.*, 2004).
- 4.- Alteración de las uniones intercelulares: inhibición de la función de la molécula de adhesión L1 (L1-CAM) impidiendo la correcta migración y conexión de las células (Bearer *et al.*, 1999).
- 5.- Alteración del aporte energético: modificaciones en el uso y captación de la glucosa (Miller y Dow-Edwards, 1988; Snyder *et al.*, 1992), supresión de la síntesis proteica y de ADN (Shibley y Pennington, 1997).
- 6.- Desregulación del desarrollo celular: ciclo celular alterado, gliogénesis y neurogénesis afectada espacial y temporalmente, descoordinación en la proliferación y migración celulares, neuritogénesis, crecimiento axonal, sinaptogénesis y proceso de mielinización (Phillips, 1989; Miller, 1992; Miller y Robertson, 1993; Lindsley *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005).
- 7.- Fuentes secundarias de daño: alteración de factores intrauterinos/placentarios (Randall *et al.*, 1995), hipoxia/isquemia (Altura *et al.*, 1982) y producción de acetaldehído (Holownia *et al.*, 1996).

1.1.3.4 Periodos críticos durante el desarrollo fetal.

Existen diversos factores biológicos y ambientales que influyen en los efectos del alcohol sobre el desarrollo cerebral, estos son: la dosis de alcohol, el patrón y momento de exposición durante el desarrollo, la base genética de los individuos, la nutrición materna, la edad de la madre, el nivel socioeconómico y las reacciones aditivas o sinérgicas con otras sustancias de abuso. Aunque principalmente son los niveles de alcohol que llegan al feto y la duración de

la exposición lo que define el tipo y alcance del daño producido (Maier *et al.*, 1996). Por eso, no todos los individuos expuestos a concentraciones similares de alcohol durante la gestación sufren el mismo daño.

Aunque a partir de los estudios que se han realizado hasta el momento, es difícil establecer en qué fases de la gestación el feto es más vulnerable a los efectos adversos del alcohol, algunos resultados clínicos y experimentales indican que el consumo de altas cantidades de alcohol al inicio de la gestación (primer mes de embarazo), es particularmente crítico para la aparición de malformaciones faciales y retraso mental. Por ejemplo, la dismorfología facial (característica del SAF) y otras malformaciones suelen aparecer cuando se ha estado expuesto a dosis muy elevadas de alcohol durante la etapa embrionaria (0-8 semanas) (Sulik, 2005).

Ernhart *et al.* (1987) observaron una relación dosis-dependiente entre las anomalías craneofaciales en los niños y el consumo materno de alcohol (28-85 g alcohol/día) alrededor del momento de la concepción. Estos autores también encontraron una relación entre dismorfia facial y desarrollo intelectual en los niños. Al mismo tiempo, Streissguth *et al.* (1990, 1994 a,b) demostraron que el consumo moderado (16 g alcohol/día) antes o durante el primer trimestre de gestación se asociaba a déficits neurocomportamentales. Como cabía esperar, Larsson *et al.* (1985) observaron que niños que habían estado expuestos durante toda la gestación (consumo materno de 28-85 g alcohol/día), presentaban problemas más graves de hiperactividad, lenguaje, déficits motores, que aquellos cuyas madres habían interrumpido su consumo de alcohol durante el segundo trimestre. Estos resultados sugieren que el desarrollo de las diferentes funciones cerebrales poseen su período crítico, y que la interrupción del consumo de alcohol siempre es beneficiosa para el desarrollo fetal.

Otro periodo crítico del desarrollo es la etapa en la que se produce la proliferación y migración de las células neuroepiteliales (entre las 8-20 semanas en humanos y entre los 12-21 días en ratas). En esta etapa, el alcohol altera la migración y la proliferación celulares, provocando una disminución neuronal y glial en el neocórtex, hipocampo y núcleo sensorial (Renau-Piqueras *et al.*, 1989; Gressens *et al.*, 1992; Miller, 1995; Rubert *et al.*, 2006). Por último, el alcohol también interfiere en la fase de crecimiento cerebral masivo (durante el tercer trimestre de gestación en humanos y neonatal en ratas). Es un período caracterizado por la gliogénesis, sinaptogénesis y el desarrollo del cerebelo, del hipocampo y del córtex. En esta etapa la exposición a alcohol puede provocar microcefalia, pérdida neuronal en el hipocampo y cerebelo (Goodlett y Lundahl, 1996; Dikranian *et al.*, 2005), alteraciones en la sinaptogénesis y la gliogénesis (Guerra y Renau-Piqueras, 1997), apoptosis (Ikonomidou *et al.*, 2000), así como déficits en el aprendizaje, la memoria y disfunciones en el comportamiento a largo plazo (Wozniak *et al.*, 2004; Popovic *et al.*, 2006).

Otro factor relevante es el genotipo materno y fetal (Polifka y Friedman, 2002). En el caso del alcohol se han descrito variaciones genéticas en las enzimas encargadas de regular su metabolización (ADH y CYP2E1) en diferentes grupos poblacionales (McCarver, 2001).

Por lo tanto, los niveles de alcohol que llegan al cerebro fetal, el momento del desarrollo en el que se expone y los genotipos (tanto de la madre como del feto), determinan principalmente el grado de afectación en la ontogenia cerebral.

1.1.4 Síndrome alcohólico fetal (SAF).

El término Síndrome Alcohólico Fetal (SAF), del inglés *Fetal Alcohol Syndrome*, (FAS) fue acuñado por Jones y Smith en 1973. Es un síndrome neurotóxico/dismorfogénico y hace referencia a un conjunto de problemas físicos, psicológicos y de comportamiento (se engloba dentro del DRAF). El SAF es un trastorno permanente que se encuentra en el extremo de un cúmulo de efectos en el feto, provocados por una exposición elevada y/o continuada del embrión y del feto al alcohol ingerido por la madre durante el periodo de gestación o lactancia. Los efectos de la exposición prenatal a alcohol se extienden en un continuo de anormalidades físicas, como la presencia de rasgos faciales dismorfogénicos y el anormal crecimiento prenatal y postnatal, y por problemas en el desarrollo del SNC, como los déficits cognitivos y de comportamiento, al final del cuales encontramos el SAF.

El SAF es el tercer tipo de retraso mental más frecuente, por detrás del síndrome del Cromosoma X Frágil y del síndrome de Down. El cociente intelectual medio en individuos con SAF es de 70 (Mattson y Riley, 1998) y alrededor de 85,9 en individuos con DRAF (Mukherjee *et al.*, 2006). El SAF ha sido adoptado como un término general para describir de forma diagnóstica el rango de efectos por la exposición prenatal a alcohol, desde intensidad leve a sintomatología severa. Con los criterios de diagnóstico actuales y utilizando una base fisiopatológica, se pueden dividir en 5 categorías las condiciones resultantes de la exposición prenatal al alcohol que se resumen en la figura 4:



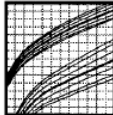



FAS with confirmed maternal exposure	■	■	■	■	■	■
FAS without confirmed maternal exposure	■	■	■	■	■	■
Partial FAS with confirmed exposure	■	■	OR	OR	OR	■
Alcohol-related birth defects (ARBD) [†]	■	■	■	■	■	■
Alcohol-related neurodevelopmental disorder (ARND) [†]	■	■	■	■	■	■
	A	B	C	D	E	F
	Confirmed Exposure to Alcohol	Facial Anomalies	Growth Retardation	CNS Abnormalities	Cognitive Abnormalities	Birth Defects
						

Figura 4. Categorías para el diagnóstico de los efectos fetales del consumo de alcohol.

Para el diagnóstico del SAF y de otras condiciones, se utilizan distintos criterios, según los cuales encontramos varias categorías o niveles de efecto del consumo de alcohol sobre el feto. Los criterios van desde la confirmación del consumo de alcohol por parte de la madre, anomalías faciales en el feto, retraso en el crecimiento, disfunciones del SNC y cognitivas y finalmente defectos en el nacimiento (*Fetal Alcohol Syndrome and Alcohol-Related Neurodevelopmental Disorders, Pediatrics, 2000*).

El diagnóstico del SAF es factible entre los 4 y los 14 años de edad. La mayoría de los signos dismórficos del SAF pueden acabar desapareciendo o diluyéndose al final de la adolescencia y la vida adulta, complicando su detección (Streissguth *et al.*, 1991). Sin embargo, se realizó el seguimiento a niños afectados por el alcohol en la edad adulta demostrándose la naturaleza profunda y persistente de la enfermedad (Streissguth *et al.*, 1994).

Por las características de las malformaciones, las consecuencias del SAF se pueden dividir en tres grupos (Jones *et al.*, 1973):

1) Deficiencias en el crecimiento pre- y postnatal.

Respecto a los déficits en el crecimiento asociados al SAF, numerosos trabajos han demostrado que tanto el consumo de altas como de bajas cantidades de alcohol durante la gestación induce déficits en el crecimiento pre y postnatal. De hecho, el 80% de niños con SAF muestran déficits en la talla y peso corporal.

2) Alteraciones craneofaciales.

Dado que la deficiencia mental y el retraso en el crecimiento son características comunes en muchos procesos patológicos, se ha realizado un gran esfuerzo para intentar definir con precisión el patrón craneofacial que se observa en niños con SAF, como posible marcador en el diagnóstico de este síndrome.

La cara “típica” de los niños con SAF muestra unas características comunes en todos ellos (ojos pequeños, pliegues epicánticos, desaparición del surco nasolabial, labio superior delgado) y diferentes, en su conjunto, a los presentes en otros síndromes.

Distintos estudios demuestran, que junto a las alteraciones fenotípicas en los ojos (ej., fisuras palpebrales cortas, pliegues epicánticos), algunos pacientes con SAF presentan problemas importantes en el sistema visual, que parecen estar relacionados con la vulnerabilidad del sistema nervioso al efecto tóxico del alcohol, que se manifiesta también con una elevada frecuencia en los problemas auditivos presentes en niños con dicho síndrome (Connor *et al.*, 1999). Estos déficits se han asociado a alteraciones en el cortex auditivo y en el cuerpo caloso.

Las anomalías craneofaciales características de estos individuos, incluyen: cavidades oculares pequeñas, ptosis palpebral y estrabismo, nariz pequeña con puente nasal ancho y labio superior grande, como se observa en la figura 5.

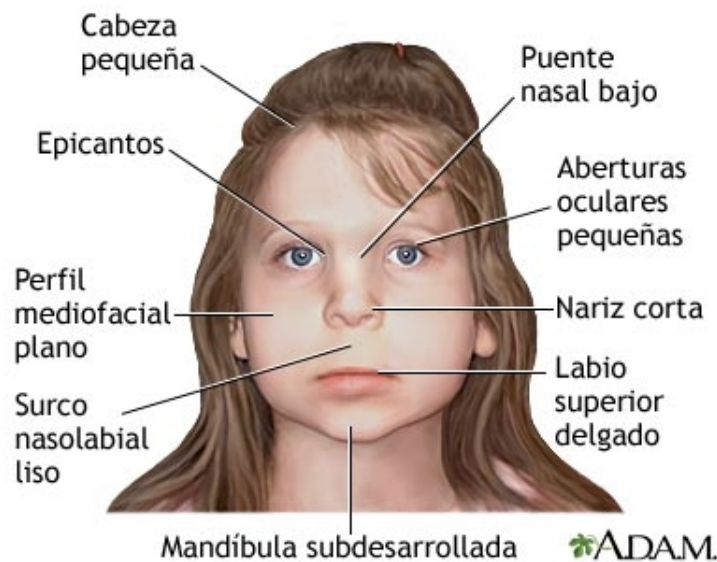


Figura 5. Patrón de anomalías craneofaciales comunes del SAF.

Se observan algunas de las malformaciones craneofaciales consecuencias del SAF más comunes y fácilmente distinguibles como, ojos pequeños, pliegues epicánticos, y el labio superior delgado y falta de surco nasolabial (Modificado de ADAM.com).

3) Disfunciones del SNC en niños con SAF.

Los niños con SAF son, habitualmente, microcéfalos (el 80% aproximadamente) e hidrocéfalos en el momento del nacimiento (Guerra *et al.*, 2002; Streissguth *et al.*, 1994) y, generalmente, éste es el primer indicio indicativo de una disfunción del SNC (figura 6). Los recién nacidos suelen ser irritables y temblorosos. Suelen efectuar una débil succión durante la lactancia y con frecuencia muestran malestar ante cualquier estímulo sensorial (Streissguth *et al.*, 1978). El cerebro de niños con SAF, además de poseer un menor tamaño, presenta graves malformaciones estructurales. En autopsias de niños con SAF se han observado anomalías en el desarrollo neuronal y glial que se han interpretado como resultado de un fallo o una interrupción en las migraciones de estos tipos celulares (Clarren *et al.*, 1978). La corteza y la sustancia blanca son reconocibles, pero ambas áreas son más delgadas de lo normal, encontrándose grupos celulares heterotópicos que rodean los ventrículos dilatados y aparecen en la sustancia blanca. Igualmente, el cerebelo y la fosa posterior se encuentran frecuentemente reducidos de tamaño.



Figura 6. Microcefalia en individuos con SAF.

Comparación del tamaño de dos cerebros de 6 semanas de edad. Se observan una evidente disminución en el tamaño del cerebro de un individuo con SAF (derecha) respecto a otro individuo normal (izquierda), además de graves malformaciones estructurales en el cerebro SAF (Clarren *et al.*, 1978).

Las malformaciones cerebrales mayores, como son la anencefalia, porencefalia, mielomeningocele o la obstrucción del sistema ventricular con hidrocefalia, se presentan de forma ocasional en el SAF, y pueden ser interpretadas, también, como interrupciones específicas de la migración neuronal (Clarren, 1981; Wisniewski *et al.*, 1983).

Las alteraciones morfológicas descritas anteriormente responden a los efectos teratogénicos del alcohol durante la morfogénesis inicial del SNC y se han relacionado con importantes alteraciones funcionales y cognitivas, que se manifiestan con retraso mental, trastornos neuropsicológicos, alteraciones de la visión, audición, epilepsia, disfunciones motoras, de la memoria y del aprendizaje (Streissguth y O'Malley 2000). De hecho, las alteraciones a nivel del SNC son la consecuencia más dramática y permanente de la exposición prenatal al alcohol y se observan tanto en niños con el SAF completo como en individuos expuestos prenatalmente al alcohol que no presentan ninguna anomalía fenotípica. En la etapa preescolar los niños con SAF suelen ser hiperactivos, impulsivos, con deficiencia en la función motora tanto en movimientos finos como gruesos, deficiencia en el lenguaje y problemas de comportamiento. En todas las etapas se suelen evidenciar déficits en la atención y función intelectual encontrándose un rango del cociente intelectual medio (CI) de 65. Estudios de seguimiento de niños con SAF, en diferentes poblaciones indican que cuando estos niños llegan a la edad adulta, y aunque algunas características iniciales del SAF (disminución del peso y caracteres dismórficos faciales) son menos marcadas, los déficits en la función intelectual y cognitiva, y los trastornos psicológicos parecen acentuarse (Streissguth *et al.*, 1994; Famy *et al.*, 1998). Además, mediante la utilización de técnicas como la tomografía de emisión de positrones y resonancia magnética nuclear, se ha demostrado que los niños con SAF presentan un volumen de cerebro más reducido, una disminución en el tamaño del cerebelo y anomalías en el desarrollo del vermis cerebelar, cerebro medio (agénesis e hipoplasia del cuerpo caloso), ganglio basal y diencéfalo. Todas estas alteraciones y malformaciones en órganos y aparatos se han relacionado con los mencionados retraso mental, alteraciones cognitivas y del comportamiento en estos niños (tabla 2).

Malformaciones y alteraciones propias del SAF

Crecimiento:

- Hipotonía.
- Retraso en el crecimiento prenatal y postnatal.
- Disminución del tejido adiposo.

Habilidades cognitivas:

- Hiperactividad.
- Retraso psicomotor/mental.
- Hipotonía.
- Alteración motora fina/coordinación.
- Problemas de lenguaje.
- Problemas comportamiento/psicosociales.

Alteraciones faciales:

- Microcefalia.
- Hendiduras palpebrales pequeñas.
- Ptosis (caída del párpado superior).
- Retrognatia (posición del maxilar inferior por detrás de la línea de la frente (lactante)).
- Hipoplasia maxilar.
- Labio superior fino.
- Nariz corta antevertida.
- Micrognatia (adolescente).

Esqueleto:

- Contracturas en flexión de articulaciones, dislocación congénita de la cadera.
- Defectos de posición del pie.
- Sinóstosis radiocubital.
- Alargamiento terminal de las falanges.
- Hipoplasia de las uñas (manos y pies).
- Anomalías de la columna vertebral cervical.
- Anomalías de los surcos palmares.
- Pectum excavatum (hundimiento de la región esternal).

Corazón:

- Defecto del tabique interventricular.
- Defecto del tabique interauricular.
- Tetralogía de Fallot/anomalías de grandes vasos.

Otros:

- Labio leporino y/o fisura palatina.
 - Miopía.
 - Estrabismo.
 - Epicantus (pliegue dérmico palpebral que puede ocultar parte del globo ocular).
 - Maloclusión dental, sordera, orejas prominentes, etc.
-

Tabla 2. Malformaciones y alteraciones del SAF.

Tabla resumen de las principales malformaciones en individuos con SAF (Modificado de *Committee on Substance Abuse and Committee on Children with Disabilities, American Academy of Paediatrics, 1993*).

1.1.4.1 Prevalencia del síndrome alcohólico fetal.

La prevalencia del SAF es muy variable y depende de varios factores tales como diferencias en la cantidad y/o patrón de consumo de alcohol en la población estudiada, factores socioeconómicos, historial clínico de la madre (ej., consumo de otras drogas, nutrición), y el reconocimiento del síndrome por los clínicos.

Los métodos epidemiológicos utilizados para estudiar la prevalencia y características del DRAF, SAF, ARBD (Alcohol Related Brain Damage), y ARND (Alcohol-Related Neurodevelopmental Disorder) han progresado sustancialmente, lo que ha permitido establecer un perfil general de aquellas madres con una mayor probabilidad de tener hijos con alteraciones debidas a la exposición prenatal al alcohol (tabla 3). El SAF presenta una incidencia de 2 de cada 1.000 nacimientos en Europa y EE.UU. (May y Gossage, 2001). La prevalencia del SAF estimada por el IOM (*Institute of Medicine*) está entre 0,5 y 3,0 por cada 1000 niños nacidos vivos, mientras que la prevalencia del SAF y ARBD combinados es de al menos el 1% de todos los nacidos vivos. Esta prevalencia confirma la percepción de muchos especialistas de que la exposición prenatal al alcohol es un problema muy grave y de que se trata de la causa conocida más importante y prevenible de retraso mental en el mundo occidental.

Prevalencia del DRAF	
País	Prevalencia/1.000 nacimientos
Europa	20-50
Estados Unidos	10,0
Sudáfrica	68,0 - 89,2
Rusia	141,0
Canadá	0,5
Italia	120,0

Tabla 3. Prevalencia del DRAF.

Se muestran los diferentes valores de la prevalencia del DRAF por cada 1.000 nacimientos en distintos países y regiones (*Institute of Medicine, USA*).

Se considera que por cada individuo diagnosticado de SAF existen 10 no diagnosticados que sufren efectos adversos por consumo materno de alcohol.

1.1.4.2 Dosis umbral de alcohol.

La dosis umbral o dosis “libre de riesgos”, se podría definir como la cantidad de alcohol por debajo de la cual no se observan efectos adversos. Sin embargo, en humanos es difícil establecer esta dosis umbral o “segura” debido a las enormes diferencias genéticas e interindividuales, tanto en el metabolismo de alcohol como en la vulnerabilidad a este tóxico. De hecho, en el caso del alcohol no se ha podido establecer claramente este umbral, aunque existen algunos estudios que sugieren dosis por debajo de las cuales no se observan determinados efectos. El alcohol, al ser capaz de atravesar tanto la barrera hematoencefálica como la placentaria, cualquier dosis de alcohol durante el embarazo supone un riesgo potencial para el feto.

Existen evidencias de que el consumo de alcohol a dosis consideradas socialmente aceptables (<7 bebidas/semana o <3 bebidas/día) durante el embarazo, pueden provocar efectos adversos en el feto (Bearer, 2001). Se ha asociado el consumo de una o más bebidas alcohólicas por día, con un mayor riesgo de dar a luz a un bebé con retraso en el crecimiento (definiéndose una bebida alcohólica como 44 ml de bebidas destiladas, 150 ml de vino, o 350 ml de cerveza) (Mills *et al.*, 1984). Aunque otros autores no observaron déficits intelectuales en niños cuyas madres habían consumido menos de 14 g de alcohol/día (0,8 bebidas alcohólicas) durante la gestación (Jacobson *et al.*, 1994). Sin embargo, sugieren que esta dosis no se puede tomar como umbral, ya que estos niños pueden tener otros déficits cognitivos que se manifiesten en la edad adulta, como se demuestra en el estudio de Streissguth *et al.* (1994 a,b), en el cual la autora sugiere que no existe dosis umbral para los efectos neurocomportamentales del alcohol, y recomienda la abstinencia total durante la gestación (Streissguth, 1993). Además, como parte del alcohol consumido puede ser transmitido a través de la leche materna, también se recomienda no consumir alcohol durante el periodo de lactancia.

1.1.5 Efectos del alcohol en la glía.

Estudios clínicos y experimentales han demostrado que la exposición fetal y/o neonatal al alcohol afecta profundamente a las funciones gliales (Guerri y Renau-Piqueras, 1997; Guerri *et al.*, 2001; 2002). La exposición a alcohol durante la embriogénesis, reduce el conjunto de progenitores de la glía radial (GR) telencefálicos y su transformación en neuronas y astrocitos (Rubert *et al.*, 2006) y afecta a la morfología de la GR. El alcohol también deteriora la proliferación, supervivencia, y funciones astrogiales (Guerri *et al.*, 2001, 2002) que pueden afectar muchos procesos de desarrollo, tales como la disponibilidad de las moléculas de soporte trófico implicados en la supervivencia neuronal, la modulación de la formación de sinapsis maduras y la regulación de la transmisión sináptica (Pascual y Guerri, 2007). Estudios de

neuroimagen de los individuos con SAF han mostrado pérdidas más importantes en las estructuras de la sustancia blanca (compuesta principalmente por astrocitos, oligodendrocitos y la mielina) que en las estructuras de la sustancia gris (Riikonen *et al.*, 1999; Archibald *et al.*, 2001; Sowell *et al.*, 2001a, 2002b). Dado que las células astrogiales desempeñan papeles críticos en los procesos metabólicos vinculados con la actividad neuronal, tales como el flujo de sangre, la energía y la utilización de la glucosa (Magistretti, 2006), los resultados sugieren que el deterioro glial inducido por el alcohol durante el desarrollo del cerebro podría afectar a la actividad neuronal, conduciendo a alteraciones estructurales y metabólicas en el cerebro de forma permanente. Existen pruebas experimentales que ponen de manifiesto la vulnerabilidad de las células gliales a los efectos teratogénicos de alcohol y las consecuencias permanentes de estos efectos (Tomás, 2005; Guerri, 2001). Sin embargo, también puede haber algunos efectos mediados por neuronas, ya que algunos estudios sugieren que, el aumento de la muerte neuronal tras la administración de alcohol, puede afectar a los astrocitos de forma indirecta (Goodlett y Lundahl, 1996; Ikonomidou *et al.*, 2000; Olney, 2004).

1.1.6 Teratogénesis del alcohol en modelos experimentales.

Se ha conseguido reproducir las características más evidentes de los individuos con desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal (DRAF) en varios modelos animales expuestos a alcohol durante el desarrollo como ratas, ratones, pollos o primates (Goodlett y Horn, 2001; Cud, 2005). Estos modelos animales permiten estudiar los efectos de la exposición fetal a alcohol en el contexto de un organismo, sobre el cual se pueden controlar diversos factores que influyen en la estructura, función y conducta del desarrollo del SNC. Estos factores son el patrón y duración de la exposición, la concentración de alcohol en sangre, el período gestacional y los tipos celulares o regiones cerebrales afectadas. Además, se pueden regular las condiciones habitualmente “no controlables” como la nutrición, la base genética o el uso/abuso de otras sustancias, que pueden afectar también al desarrollo cerebral.

No obstante los modelos animales de exposición fetal a alcohol presentan inconvenientes. Existen diferencias en el proceso gestacional. Por ejemplo, en ratas los primeros 10 días postnatales equivalen al tercer trimestre en humanos (Dobbing y Sands, 1979). Por otro lado, también existen diferencias entre animales y humanos en el metabolismo del alcohol y en la complejidad del SNC. Asimismo, antes de iniciar un estudio con animales debe considerarse el momento en que se desarrolla la estructura cerebral de interés, los momentos del desarrollo en los cuales administrar el alcohol y evaluar las alteraciones. Otro inconveniente, es que ningún modelo animal con SAF muestra todas las alteraciones diagnosticables en humanos. Por todo ello, es importante considerar previamente el campo a estudiar antes de escoger un modelo

animal (Cudd, 2005). Obviamente, la concentración de alcohol a la que se exponga el cerebro fetal del animal debe ser similar a las concentraciones encontradas en madres gestantes.

1.1.6.1 Modelos *in vitro*.

Los modelos *in vitro*, células o tejidos, nos permiten un estudio más minucioso y exhaustivo de los efectos directos del alcohol sobre las células. Existen diversos estudios realizados en cultivos primarios o líneas celulares (Pantazis *et al.*, 1998), que nos indican la capacidad del alcohol de inducir apoptosis (Bhave y Hoffman, 1997), generar estrés oxidativo (Chen y Sulik, 1996), alterar la adhesión celular (Ramanathan *et al.*, 1996), perturbar la producción o respuesta a factores neurotróficos (Cui *et al.*, 1997) y moléculas reguladoras del desarrollo (Deltour *et al.*, 1996).

De las múltiples células neurales, las células gliales son una diana importante de la teratogénesis del alcohol debido a su implicación en múltiples procesos del desarrollo.

Evidencias experimentales demuestran que la exposición fetal a alcohol es lesiva:

1. Disminuye la población de glía radial y su consecuente aporte de neuronas y astrocitos (Rubert *et al.*, 2006).
2. Altera la proliferación y supervivencia glial, lo que repercute en el aporte trófico a las neuronas y en la regulación de la sinaptogénesis (Pascual y Guerri, 2007).
3. Produce pérdidas importantes de sustancia blanca, principalmente astrocitos, oligodendrocitos y mielina (Sowell *et al.*, 2002).
4. Afecta al metabolismo cerebral a causa de alteraciones gliales (Fagerlund *et al.*, 2006).

En resumen, la alteración de la glía en el desarrollo cerebral provocada por el alcohol va a condicionar o a afectar a la actividad neuronal, induciendo alteraciones metabólicas y estructurales permanentes, estableciéndose una conexión entre los efectos teratogénicos del alcohol, las células gliales y las consecuencias permanentes en el SNC.

Por el contrario, la principal desventaja de este tipo de modelos es la extrapolación de los mecanismos de acción vistos *in vitro*, a conjuntos de señalización que se producen simultáneamente e interaccionan en un cerebro en desarrollo. Sin embargo, el poder manipular las células o tejidos y su ambiente, nos permite elucidar los mecanismos por los cuales el alcohol afecta al desarrollo, información que no podemos obtener, o con mucha mayor dificultad, en modelos animales.

Gracias a los estudios realizados *in vitro*, se han conseguido entender el origen y la casuística de múltiples alteraciones observadas en el SAF, así como los mecanismos moleculares y celulares por los cuales el alcohol ejerce sus efectos teratogénicos.

1.2. El síndrome de Down.

El síndrome de Down (SD) fue descrito por primera vez en la literatura por John Langdon Down en 1866. A Down se le atribuye ser la primera persona en agrupar y describir a los individuos con síndrome de Down en base a sus similitudes fenotípicas para definir un subgrupo de individuos con deterioro cognitivo (Stratford, 1989; Pueschel, 1998; Kava *et al.*, 2004; Megarbane *et al.*, 2009), aunque no llegó a descubrir las causas que la producían. La verdadera causa del SD - la trisomía del cromosoma 21 - no sería probada hasta 1959, cuando Jérôme Lejeune descubrió que individuos con SD tenían una copia extra del cromosoma 21 (LeJeune *et al.*, 1959). Se le denominó “síndrome” ya que es un conjunto de síntomas y no una “enfermedad”, que se define como las causas o efectos de un síntoma. Los síndromes pueden causar, como en este caso, enfermedades.

Los individuos con SD se caracterizan por unos rasgos físicos determinados y un grado variable de penetrancia, afectando a distintos órganos y presentando discapacidad cognitiva (caracterizada por un funcionamiento intelectual y social significativamente inferior a la media). Además, numerosos defectos en el desarrollo están asociados con el SD (Antonarakis y Epstein, 2006; Delabar *et al.*, 2006), incluyendo defectos esqueléticos, cardiovasculares y del sistema gastrointestinal (Delabar *et al.*, 2006). También se observan alteraciones en el desarrollo del cerebro, y la mayoría de los individuos con SD desarrollan en la madurez características neuropatológicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer (Ball *et al.*, 1980, Hof *et al.*, 1995; Holland *et al.*, 2000; Folin *et al.*, 2003; Nadel *et al.*, 2003; Lott *et al.*, 2005). Sin embargo, la única característica común en todos los casos de SD es la discapacidad cognitiva.

Hoy sabemos que el SD es la alteración genética más común asociada típicamente a la discapacidad intelectual, se encuentra en todos los grupos étnicos y estatus socioeconómicos en todo el mundo, y posee una incidencia de aproximadamente 1:700-800 individuos nacidos vivos (Roizen y Patterson, 2003; Kuppermann *et al.*, 2006; Azman *et al.*, 2007). En promedio, más de 700 niños nacen con SD cada día en todo el mundo, unos 255.000 al año. Se ha observado un efecto de la edad para la madre (Freeman *et al.*, 2007), siendo el riesgo de tener un hijo con síndrome de Down en mujeres de 35 a 39 años 6,5 veces mayor que el de mujeres de 20-24 años de edad, y que el riesgo aumenta unas 20,5 veces en las mujeres de 40-44 años de edad (Kava *et al.*, 2004). Sin embargo, la mayoría de los niños con SD (63%) son hijos de madres jóvenes

porque las madres jóvenes tienden a tener un mayor número de hijos que las madres de mayor edad (Kava *et al.*, 2004).

Los individuos con síndrome de Down tienen cocientes intelectuales (CI) en el rango de 20-85 (Lyle *et al.*, 1972; Byard, 2007). En la década de 1960 sólo el 4% de los individuos con SD aprendió a leer y sólo el 2% aprendió a escribir (Lyle *et al.*, 1972), pero estos porcentajes son más altos en la actualidad. La esperanza de vida de los individuos con SD es generalmente inferior a la media y varía según sea la severidad del fenotipo. Sin embargo, en los últimos años debido al cuidado médico y social, su esperanza de vida se ha visto aumentada significativamente (Glasson *et al.*, 2002; Bittles *et al.*, 2004; Bittles *et al.*, 2007), aumentado de forma constante desde los 9 años en 1900, pasando por los 16-30 años en 1960, y hasta más de 50 años en la actualidad (Roizen y Patterson, 2003; Megarbane *et al.*, 2009), lo que ha provocado un aumento de la prevalencia (Einfeld y Brown, 2010).

1.2.1 Situación actual del síndrome de Down en España.

De acuerdo con la información que recoge la Federación Española de Instituciones del síndrome de Down (FEISD) en su plan de acción para estas personas durante el período 2002-2006 y según los datos ofrecidos por el Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECMC, 2006), durante el período 1980-2005 se diagnosticó el síndrome de Down, cada año, con menos frecuencia. A lo largo de ese tiempo se aprecia una tendencia a la disminución de la incidencia, que ha hecho que en los últimos años, la proporción de recién nacidos con este síndrome haya descendido hasta valores cercanos a 11 por 10.000 a finales de los años 90 en comparación con el 16,5 por 10.000 nacidos en 1988. El nacimiento de personas con este síndrome sigue descendiendo de manera significativa a lo largo de los años, siendo el descenso medio anual de 37 casos por cada millón de nacimientos. En el año 2000 alcanzó la cifra de 8,79 por 10.000 nacimientos y en el 2005 sigue disminuyendo hasta 8,90 por 10.000 (tabla 4).

	1980-1985			1986-2004			2005		
	Nº	Por 10.000	LC 95%	Nº	Por 10.000	LC 95%	Nº	Por 10.000	LC 95%
Síndrome de Down*	565	14,78	13,58-16,02	1822	10,95	10,46-11,46	79	8,90	5,86-9,12

Tabla 4. Evolución general de la prevalencia del síndrome de Down en España.

Se muestran los datos de diagnóstico de síndrome de Down en España, en tres periodos de tiempo (1980-2005). Se aprecia una tendencia a la disminución de la prevalencia con los años. El nacimiento de personas con SD continúa descendiendo de forma significativa a lo largo de los años, con un descenso medio anual de 37 casos por cada millón de nacimientos (0,37/10.000), desde el 8,79/10.000 en el año 2000, hasta el 8,90/10.000 en el año 2005 (*Tendencia lineal decreciente estadísticamente significativa; LC: Límites de confianza) (ECEMC, Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas, 2006).

Por comunidades autónomas (tabla 5) encontramos, según la ECEMC, que existe una tendencia lineal decreciente estadísticamente significativa en Andalucía, Castilla La Mancha, Galicia, Región de Murcia y País Vasco.

	1980-1985	1986-2004	2005
Andalucía	15,37	13,61	5,30*
Aragón	-	11,14	-
Principado de Asturias	23,32	10,32	23,97
Islas Baleares	4,47	13,10	5,36
Canarias	12,85	7,49	11,88
Cantabria	-	9,98	8,43
Castilla-La Mancha	15,63	12,37	8,87*
Castilla y León	14,68	12,42	7,01
Cataluña	16,55	8,25	7,48*
Comunidad Valenciana	10,63	7,52	5,94
Extremadura	15,13	10,68	5,44
Galicia	12,63	7,82	2,48*
La Rioja	12,55	8,21	-
Comunidad de Madrid	16,45	12,80	16,58
Región de Murcia	22,13	12,10	10,35
Comunidad foral de Navarra	14,78	15,92	-
País Vasco	13,60	9,30	5,58
Total	14,78	10,95	8,90*

Tabla 5. Evolución de la prevalencia del síndrome de Down por comunidades autónomas.

Se muestran los datos de diagnóstico de síndrome de Down en tres periodos de tiempo (1980-2005) clasificados por comunidades autónomas. Podemos ver una tendencia a la baja en la prevalencia en los últimos años, descendiendo a un promedio anual a razón de 4,1 niños menos con SD por cada 100.000 nacimientos (0,41/10.000). En valores totales pasa de 10,95/10.000 casos entre 1986-2004 a 8,90/10.000 en el año 2005 (*Tendencia lineal decreciente estadísticamente significativa) (ECEMC, Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas, 2006).

Un factor que condiciona la incidencia del síndrome de Down es la tasa de abortos inducidos tras la confirmación de un diagnóstico prenatal. Según los datos recogidos por FEISD (2002), alrededor de un tercio de los embarazos en los que el feto presenta anomalías cromosómicas no llegan a término.

Según la ECEMC, de todas las anomalías cromosómicas la que ha sufrido un mayor declive es el síndrome de Down, que viene descendiendo anualmente a razón de un promedio de 4,1 niños menos con este síndrome por cada 100.000 nacimientos (0,41 por 10.000). Dicho descenso es mucho más acusado en el grupo de madres cuya edad es igual o superior a 35 años, ya que en este grupo de edad materna nacen cada año una media de 31,3 niños menos con síndrome de Down por cada 100.000 nacimientos, mientras que entre las mujeres más jóvenes el descenso medio anual es de 1,5 niños menos afectados por cada 100.000 nacimientos.

Debido a que la edad de la madre es un claro factor de riesgo, es más probable que las pruebas diagnósticas se realicen en los embarazos de mujeres de mayor edad, razón por la que algunos estudios han detectado una tendencia a la reducción de la proporción de nacidos vivos con síndrome de Down de madres de más de 30 años, reducción que no se produce o, si lo hace, es en mucha menor medida en el caso de madres jóvenes.

La última encuesta sobre Discapacidades, Deficiencias y Estado de Salud fue realizada en 1999 por el Instituto Nacional de Estadística recogida en FEISD (2002) y estima que viven en España algo más de 32.000 personas con síndrome de Down. La amplitud de la base muestral de la encuesta (se visitaron 70.500 hogares en los que residían 218.195 personas), garantiza, en principio, la fiabilidad global de esa estimación, pero no permite profundizar demasiado en el conocimiento de los perfiles de la población con síndrome de Down, ni realizar desagregaciones territoriales. Por ello, los datos que a continuación se ofrecen deben ser interpretados con cautela.

Se aprecia que, del total de personas con síndrome de Down que viven en España, 15.790 son mujeres, y 16.319 son hombres. La distribución de estas personas por grupo de edad y sexo se puede ver en la tabla 6.

GRUPO DE EDAD	MUJERES	VARONES	TOTAL
00 a 04	947	572	1.519
05 a 09	1.997	1.571	3.568
10 a 14	866	1.061	1.926
15 a 19	1.690	1.705	3.395
20 a 24	1.971	2.408	4.379
25 a 29	2.007	1.819	3.826
30 a 34	2.000	3.112	5.111
35 a 39	1.539	1.119	2.658
40 a 44	537	1.733	2.270
45 a 49	923	331	1.254
50 a 54	886	334	1.220
55 y más	428	554	982
Total	15.790	16.319	32.108

Tabla 6. Distribución de personas con síndrome de Down por grupos de edad y sexo.

Los datos mostrados confirman que el porcentaje de ambos sexos para este tipo de discapacidad es aproximadamente el mismo. También se puede apreciar que las personas con este síndrome son cada vez más longevas (el 10,8% supera los 45 años) (FEISD, Plan de acción para las personas con síndrome de Down en España, 2002).

La incidencia del síndrome de Down es dependiente de la edad de la madre. Una mujer de 35 años tiene una probabilidad de 1 en 350 de concebir a un niño con síndrome de Down, y esta posibilidad aumenta gradualmente a 1 en 100 por 40 años. A los 45 años la incidencia es aproximadamente de 1 en 30 (tabla 7).

Incidencia del SD por grupos de edad					
Edad de la madre	Incidencia del SD	Edad de la madre	Incidencia del SD	Edad de la madre	Incidencia del SD
20	1 en 2.000	30	1 en 900	40	1 en 100
22	1 en 1.500	32	1 en 720	42	1 en 70
24	1 en 1.300	34	1 en 150	44	1 en 40
26	1 en 1.100	36	1 en 300	46	1 en 25
28	1 en 1.000	38	1 en 200	48	1 en 15

Tabla 7. Incidencia del síndrome de Down por grupos de edad.

Se muestran los datos de incidencia del síndrome de Down por grupos de edad de la madre, entre los 20 y los 48 años. La probabilidad de concebir a un niño con síndrome de Down aumenta gradualmente desde 1 en 2.000 a los 20 años, hasta los 1 en 15 a los 48 años, poniendo de manifiesto que la edad de la madre es un claro factor de riesgo (NDSS, *National Down Syndrome Society*).

Dado que muchas parejas están retrasando la edad de la maternidad, se espera que la incidencia de concepciones de bebés con síndrome de Down aumente, por lo que, el asesoramiento genético acerca de la incidencia de síndrome de Down para los padres es cada

vez más importante, así como los avances en el diagnóstico y los protocolos de atención y tratamiento de los bebés que nacen con síndrome de Down.

1.2.2 Causas del síndrome de Down.

La causa genética de este trastorno se encuentra en la presencia de una copia extra del cromosoma 21 (Hsa21) (Lejeune *et al.*, 1959). La trisomía del 21 causa un desequilibrio de dosis génica, el cual afecta al desarrollo para producir las diferencias fenotípicas asociadas con el SD (Megarbane *et al.*, 2009). El cromosoma Hsa21 contiene aproximadamente 1,5% del genoma humano y se ha estimado que contiene entre 225-400 genes que codifican proteínas dependiendo del método de estimación utilizado (Gardiner y Davisson, 2000; Hattori *et al.*, 2000; Gardiner *et al.*, 2003; Megarbane *et al.*, 2009). Las diferencias en las estimaciones del número de genes en el Hsa21 surgen porque algunos estudios se centran sólo en el Hsa21q porque el Hsa21p es una región pobre genéticamente, compuesta en su mayoría de genes de ARN ribosomal y secuencias repetidas (Hattori *et al.*, 2000; Megarbane *et al.*, 2009). En algunos casos, los individuos con SD tienen solo una trisomía parcial del cromosoma. Se ha caracterizado a la parte distal del brazo largo del cromosoma 21 como “la región crítica del SD” ya que ha sido relacionada con el desarrollo de las discapacidades cognitivas. Este hecho explicaría la existencia de un fenotipo variable en el SD (Dierssen y Ramakers, 2006).

El SD puede ser el resultado de distintas anomalías genéticas: la trisomía del cromosoma 21, la translocación y el mosaicismo.

1) Trisomía del 21.

Es la principal causa de SD, con un 95% de personas afectadas (Fisher, 1983; Hassold *et al.*, 1993). La trisomía es común en los seres humanos y causa aneuploidía en un 10-35% de las concepciones aproximadamente, muchos de los cuales terminan en abortos espontáneos o producen niños con déficits cognitivos y/o defectos en el nacimiento (Freeman *et al.*, 2007), ya que no es letal para el feto ni en periodos tempranos postnatales. La trisomía del 21 es la causa de aproximadamente el 95% de las personas que viven con SD en todo el mundo (Kava *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2007; Azman *et al.*, 2007). En la trisomía del 21, muchas de las concepciones se pierden antes de llegar a término, siendo aproximadamente el 75% durante el primer trimestre y 50% durante el segundo trimestre (Roper y Reeves, 2006; Freeman *et al.*, 2007).

La trisomía del cromosoma 21 se origina en la formación de los gametos, cuando en una célula el cromosoma 21 falla en la segregación, porque se adhieren entre sí durante la anafase -

período del ciclo celular en el que las fibras del huso tiran de las cromátidas hermanas hacia los polos opuestos para asegurar que cada célula hija reciba una dotación cromosómica correcta (Petersen y Mikkelsen, 2000). Este proceso de separación cromosómica defectuoso se llama disyunción incompleta, porque los dos cromosomas no logran separarse correctamente durante la división celular normal. Esta división defectuosa produce dos células anormales: una con tres copias del cromosoma 21 (figura 7) y otra con una sola copia del cromosoma 21. La célula con una sola copia del cromosoma 21 no es viable, sin embargo, la célula con tres copias del cromosoma 21 es viable, lo que origina individuos con SD. La edad materna avanzada es el único factor de riesgo bien documentado para el aumento de la probabilidad de que se produzca la trisomía (Penrose, 1951). La trisomía puede ocurrir durante la mitosis o durante la meiosis. Sin embargo, la probabilidad de que la no disyunción del cromosoma 21 ocurra durante la primera división celular mitótica tras la fecundación es muy baja, y sólo se producen en aproximadamente el 2,7-3,8% de todos los casos de SD (Petersen y Mikkelsen, 2000; Freeman *et al.*, 2007).

Mientras que la no disyunción puede ocurrir durante la primera división celular tras la fecundación, es más probable que la no disyunción del cromosoma 21 se produzca durante la primera división celular meiótica, tanto del óvulo (ovocito) en la madre o del espermatozoide (espermatozocito) en el padre. Pruebas de cariotipo de los individuos con SD indican que la copia extra del cromosoma 21 es resultado de un error en la división del óvulo de la madre en un 92,8-93,2% de las veces, y de un error en la división de espermatozoide paterno en un 4,1 a 5,5% de las veces (Petersen y Mikkelsen, 2000; Freeman *et al.*, 2007). Errores meióticos de no disyunción son más comunes en los padres de mayor edad, aunque por lo general son de origen materno (Petersen *et al.*, 1993; Petersen y Mikkelsen, 2000).

La proporción de la trisomía de 21 entre sexos (hombres/mujeres) es de 1,16 en los fetos y 1,15 en los nacidos vivos. Se ha observado un exceso de varones en los casos de no disyunción meiótica que son origen paterno (Petersen *et al.*, 1993). Se ha planteado la hipótesis de que los mecanismos de no disyunción paterna pueden hacer que el cromosoma 21 adicional se segregue preferentemente con el cromosoma Y, lo que ayudaría a explicar la proporción sexual sesgada hacia los hombres (Petersen *et al.*, 1993; Huether *et al.*, 1996).

Sin embargo, es fácil malinterpretar la evidencia anterior que indica que los errores meióticos de los óvulos son más comunes en mujeres que en hombres. Ya que las células espermáticas que estén alteradas por una anomalía cromosómica, es posible que tengan menos probabilidades de fecundar un óvulo por delante de los millones de células espermáticas cariotípicamente normales con las que están compitiendo. Por lo tanto, la mayoría de los embarazos que resultan en la trisomía 21 ocurren de un óvulo con la no disyunción del

cromosoma 21 y el espermato normal, porque los espermatozoides anormales son menos capaces de competir con sus equivalentes normales a la hora de fecundar un ovocito.

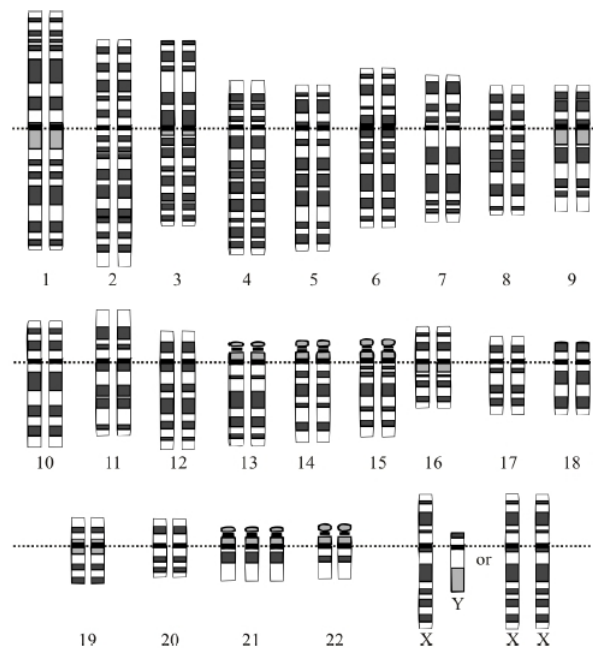


Figura 7. Cariotipo de un individuo con síndrome de Down por trisomía del 21.

Se muestra el cariotipo humano de un individuo con SD en el que se aprecia la triplicidad del cromosoma 21 (Hsa21) originado por la no disyunción en el proceso de división celular (NHGRI, *National Human Genome Research Institute*).

2) Translocación.

Es la segunda causa de SD, aun así es muy poco frecuente, con un 4,3% de las personas afectadas (Kava *et al.*, 2004; Pueschel, 1998; Freeman *et al.*, 2007). La translocación se refiere a la transferencia de la totalidad o parte de un cromosoma a una nueva posición, ya sea en el mismo cromosoma o en un cromosoma diferente. La translocación de la trisomía del 21 se produce debido a una división celular defectuosa, así; sin embargo, la copia extra del Hsa21 se une a otro cromosoma. Normalmente, este cromosoma extra se une a cualquiera de los cromosomas 14, 21, o 22 en los seres humanos, pero en raras ocasiones, puede estar unido a otro cromosoma (Pueschel, 1998). En esta situación, hay tres copias del Hsa21 en cada célula, pero el Hsa21 extra no es un cromosoma libre, ya que está adherido a otro cromosoma. Es importante identificar el SD por translocación, porque uno de los progenitores puede ser el portador y, por tanto, tienen un mayor riesgo de producir niños con SD por translocación. Este progenitor tiene la cantidad normal de material genético y será fenotípicamente normal, pero una de sus copias del cromosoma 21 está adherida a otro cromosoma. Padres con esta anomalía

genética se llaman portadores equilibrados o portadores de translocación. Por lo tanto, el SD por translocación es la única forma de SD que es hereditaria.

La trisomía parcial (es decir, trisomía segmentaria) también puede ocurrir cuando es un fragmento del cromosoma 21 el que se inserta o se une a otro cromosoma (Korenberg *et al.*, 1994). Delabar *et al.* (1993) analizaron un caso raro de una translocación parcial del cromosoma 21 en los cromosomas X en una mujer, y se basan en las características fenotípicas leves encontradas, los autores especularon que el segmento adicional del cromosoma 21 fue sometido a inactivación al azar, que por lo general ocurre en las mujeres para producir la expresión de genes en mosaico en cada cromosoma X.

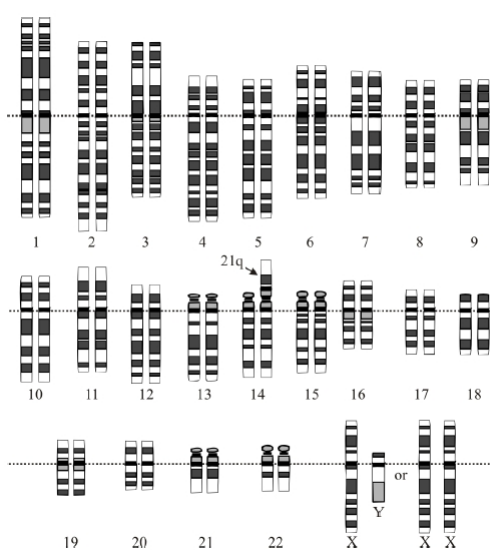


Figura 8. Cariotipo de un individuo con síndrome de Down por translocación.

Se muestra el cariotipo humano de un individuo con SD en el que se aprecia la translocación de un fragmento del cromosoma 21 (Hsa21) insertado en el cromosoma 14 (Hsa14) originado por un defecto en el proceso de división celular (NHGRI, National Human Genome Research Institute).

3) Mosaicismo.

Con un 1-4% de personas afectadas, es la tercera causa de SD (Pueschel, 1998; Kava *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2010; Petersen y Mikkelsen, 2000). El mosaicismo es una condición en la que diferentes células dentro de un individuo tienen una composición genética diferente. El mosaicismo de la trisomía del 21 se produce debido a un error mitótico tras la fecundación. Las células comienzan cariotípicamente normales tras la fecundación, y en algún momento durante la división celular, la diferenciación y el crecimiento se produce un error mitótico en alguna célula en división (Petersen y Mikkelsen, 2000). Esa célula en particular, contiene ahora 47 cromosomas en lugar de 46. Todas las células que se copien a partir de esta célula durante las

futuras divisiones de mitosis también tendrán 47 cromosomas. Esto resulta en una mezcla de células euploides y aneuploides, que forman el mosaico individual para la trisomía del 21 (Freeman *et al.*, 2007). Los individuos afectados tienen trisomía (47, XX, +21 o 47, XY, +21) y estirpes celulares euploides (46, XX o 46, XY) (Papavassiliou *et al.*, 2009). La aparición de este error tiene un efecto significativo en el resultado fenotípico. Por ejemplo, si se produce el error en un momento temprano en el desarrollo, va a afectar a muchas más estirpes celulares que si llegara a ocurrir en un momento más tardío durante el desarrollo, después de que varias poblaciones de células ya se hayan diferenciado. Esta serie de eventos produce en última instancia un efecto de mosaico en el fenotipo debido a que algunas poblaciones de células presentan la trisomía del 21 mientras que otras estirpes celulares son cariotípicamente normales. La proporción de células trisómicas puede variar según el tipo de célula y el origen embriológico (Papavassiliou *et al.*, 2009). Por ejemplo, el análisis de cariotipo de la mucosa bucal y linfocitos pueden producir diferencias significativas en los porcentajes de células trisómicas y en un caso, un niño con 11 años con SD presentó un mosaico del 50% de trisomía basado en el recuento de células bucales y un 7% de trisomía basado en recuentos de células linfocitarias (Papavassiliou *et al.*, 2009). Los análisis basados en la mucosa bucal y los linfocitos se basan en recuentos de 500 o 1.000 células (Papavassiliou *et al.*, 2009), pero en otros estudios tan solo 10 células analizadas bastan para evaluar la presencia o ausencia de la trisomía del 21. Por otra parte, en lugar de examinar todas las células recogidas, en algunos casos, las conclusiones de estos análisis pueden haberse basado en el examen de sólo las primeras células. En otras palabras, una persona puede haber sido diagnosticado con síndrome de Down completo (de disyunción) o como no tener SD basado en el examen de 2-3 células de las 10 recogidas, lo que aumenta la probabilidad de que SD de tipo mosaico haya sido mal diagnosticado e infravalorado en el pasado.

Los individuos con trisomía del 21 en mosaico con frecuencia tienen diferencias fenotípicas más leves, un menor deterioro cognitivo (medido por CI), y tienden a alcanzar los hitos del desarrollo antes que los individuos con trisomía 21 completa (Fishler *et al.*, 1976; Papavassiliou *et al.*, 2009). Las tasas de supervivencia de los niños de los 1 y 5 años diagnosticados con SD mosaico son de 97,5% y 95,7% respectivamente, la cual es más alta que las correspondientes tasas de supervivencia de SD no mosaico de 92,9% y 88,6% respectivamente (Rasmussen *et al.*, 2006; Shin *et al.*, 2010). Los niños con SD con mosaico tienen una prevalencia significativamente más baja de cardiopatías congénitas mayores que requieren cirugía (36,4%) en comparación con los niños con SD sin mosaico (49,3%) (Papavassiliou *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2010).

Utilizando un modelo de clase latente basado en observaciones fenotípicas cualitativas y cuantitativas medidas en células trisómicas, se encontraron suficientes diferencias fenotípicas

dentro de la gama de variación encontrada en el SD mosaico para separar una muestra en dos grupos. Los individuos en el grupo 1 tuvieron un valor trisómico medio de alrededor del 44% mientras que los individuos del grupo 2 eran trisómicos en un 60%. Estos hallazgos apoyan la idea de que el nivel de la trisomía se correlaciona con la severidad del fenotipo (Papavassiliou *et al.*, 2009).

1.2.3 Consecuencias del síndrome de Down.

La trisomía del cromosoma 21 induce un fenotipo variable que puede incluir deficiencias inmunes, defectos cardíacos, mayor riesgo de leucemia, y un desarrollo temprano de la enfermedad de Alzheimer. La característica más común entre todos los individuos con SD es la presencia de una discapacidad intelectual entre leve y moderada (Dierssen y Ramakers, 2006), lo que corresponde a un CI situado en el rango de 20-85 (Byard, 2007). Un aspecto esencial en este síndrome es la anomalía en los procesos de memoria y aprendizaje. Así, desde el primer año de vida, este retraso en el desarrollo y mental se vería reflejado también en los déficits existentes específicos de habla y lenguaje, y tareas cognitivas (Roizen y Patterson, 2003). Procesos como la potenciación a largo plazo (LTP), depresión a largo plazo (LTD) y el aprendizaje asociativo tienen una actividad significativamente reducida en estos individuos (Lott y Dierssen, 2010). Este defecto en el funcionamiento del SNC en los individuos con SD tanto en desarrollo como en la etapa adulta, explicaría la presencia a escala fenotípica de características como el retraso en el desarrollo junto con retraso mental. Los mecanismos neurales subyacentes a esta discapacidad pueden incluir defectos en la formación de redes neuronales, en el procesamiento de la información y la plasticidad cerebral.

La estructura cerebral y nerviosa característica influyen sobre el aprendizaje y la conducta, produciendo una discapacidad intelectual entre leve y moderada en las personas con síndrome de Down.

Varios estudios han determinado que los individuos con SD difieren fenotípicamente de individuos que no tienen SD de muchas maneras, sin embargo, no hay una comprensión clara de los mecanismos que subyacen a las anomalías presentes en su desarrollo (Antonarakis y Epstein, 2006). A continuación se describen algunas de las características típicas del fenotipo de personas con síndrome de Down. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas características son una generalización, y que como tal, ninguna persona con SD presenta el cien por cien de ellas. Las diferencias fenotípicas más importantes que encontramos en los individuos con SD las podemos clasificar en 3 grupos:

1) Diferencias generales.

Las diferencias generales que se encuentran en el SD incluyen las siguientes: ojos almendrados (Shuttleworth, 1886; Oliver, 1891), forma corneal anormal del globo ocular (Vincent *et al.*, 2005), estroma corneal delgado y una menor rigidez corneal que contribuye al astigmatismo (Haugen *et al.*, 2001), fisuras palpebrales oblicuas, una postura facial con la boca abierta, que puede incluir una lengua saliente, cuello ancho y robusto, obesidad (Buday y Eiben, 1982), manos y pies pequeños, cortos, anchos (Chumlea *et al.*, 1979), las manos suelen tener un único pliegue palmar (Azman *et al.*, 2007), dedos curvados hacia adentro, un amplio espacio entre el primer y segundo dedo de los pies, reducción del crecimiento del cerebro del feto y braquicefalia (Allanson *et al.* 1993; Guihard-Costa *et al.*, 2006), reducida velocidad de crecimiento esquelético y aumento de peso durante los 2-3 primeros años (Fernandes *et al.*, 2001), altura reducida (Rarick *et al.*, 1975), inmunodeficiencia (Abass. *et al.*, 2009), una alta frecuencia de defectos congénitos del corazón, hipotonía muscular y cierto grado de deterioro cognitivo está siempre presente.

2) Diferencias craneofaciales óseas.

Las diferencias craneofaciales óseas encontradas en individuos con SD incluyen las siguientes: braquicefalia, con una cabeza un poco más corta de lo normal, más ancha en sus lados y más plana en la región frontal y de la nuca, produciendo rostros más planos y rectos (Fraser y Mitchell, 1877), microcefalia (Benda, 1941), reducción de las distancias interorbitales (Bagic y Verzak, 2003), huesos nasales pequeños o ausentes (Greig, 1927), mandíbula y maxilar subdesarrollados (Benda, 1941), zona centrofacial plana o cóncava (Greig, 1927) como resultado de la hipoplasia del tercio medio facial (Fischer-Brandies *et al.*, 1986), desarrollo sinusal pobre o ausente (Roche *et al.*, 1961), paladar pequeño, estrecho y corto con lengua protruyente (Austin *et al.*, 1969), la morfogénesis del diente es pobre o ausente (Backman *et al.*, 2007), reducción del tamaño y asimetría de la corona del diente (Garn *et al.*, 1970), maloclusión (Roizen, 1996) y proinclinación y protrusión de los incisivos inferiores (Quintanilla *et al.*, 2002), reducción de la altura y la anchura facial (Thelander y Pryor 1966), reducción de la amplitud y la longitud de la cabeza (Bagic y Verzak, 2003), bases craneales anteriores y posteriores planas (Alio *et al.*, 2008), menor altura y longitud craneal (Seward *et al.*, 1961); y tasas de crecimiento craneofaciales reducidas (O'Riordan y Walker, 1978).

3) Diferencias craneofaciales de los tejidos blandos.

Las diferencias craneofaciales de los tejidos blandos que se encuentran en el SD incluyen las siguientes: frente prominente (Volpe, 1986), pliegues epicánticos redondeados (Oliver, 1891) que tienden a ser más prominentes durante la juventud (Eissler y Longenecker, 1962), fisuras palpebrales cortas (Farkas *et al.*, 1991), espaciados epicánticos amplios (Farkas *et al.*, 2002), puente nasal plano o deprimido (Sforza *et al.*, 2011), nariz corta y protuberancia nasal reducida (Sforza *et al.*, 2011), la nariz respingona puede estar presente (Ferrario *et al.*, 2004a), superficie nasal reducida (Sforza *et al.*, 2011), hipoplasia del tercio medio facial (Hall, 1964), zona centofacial más plana (Ferrario *et al.*, 2004a), labio inferior más pequeño y ancho, y labio superior más grande (Sforza *et al.*, 2011), reducción del surco nasolabial (Sforza *et al.*, 2011), orejas más cortas y anchas (Sforza *et al.*, 2011), mala diferenciación de la musculatura craneofacial (Bersu, 1980), reducción del tamaño general del rostro medida por distancias lineales y volumen (Sforza *et al.*, 2005a), y una cara relativamente corta (Ferrario *et al.*, 2004b). En general, los análisis transversales muestran que muchas de las medidas faciales tienden a ser más diferentes en los jóvenes (grupos de edad de 1-5 y de 6-15 años.) y se vuelven menos diferentes conforme los individuos envejecen (de 16-36 años) (Farkas *et al.*, 2002). El tratamiento con la terapia de la hormona de crecimiento durante 3 años ha demostrado no tener efecto alguno sobre la morfología craneofacial en los seres humanos con SD (Carlstedt *et al.*, 1999).

Estas listas no son exhaustivas, aunque el fenotipo craneofacial del SD siempre muestra cierto grado de dismorfología facial, hay diferencias fenotípicas que están siempre presentes (Pueschel, 1998). El fenotipo facial mostrado en el SD, probablemente depende de los antecedentes genéticos, el tipo de anomalía cromosómica que causa el SD (por ejemplo, la no disyunción, translocación o mosaicismo), la edad y el sexo (Reeves, 2006).



- Menor tono muscular al nacer
- Exceso de piel en la nuca
- Nariz achatada
- Fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba
- Orejas pequeñas
- Boca pequeña
- Manos cortas y anchas con dedos cortos
- Articulaciones separadas entre los huesos del cráneo
- Pliegue único en la palma de la mano
- Manchas blancas en la parte coloreada del ojo

Figura 9. Principales características físicas de un individuo con síndrome de Down.

Se muestran las principales características, desde las más evidentes como los ojos almendrados, hasta algunas menos conocidas como el pliegue palmar único (*Lucina Foundation*).

El retraso en el crecimiento es típico. Aunque si bien la mayoría de las personas con SD suelen ser de baja estatura, éstas se encuentran dentro de la media. Las mujeres con síndrome de Down presentan mayores índices de infertilidad, pero no son necesariamente estériles, mientras que los varones sí lo suelen ser.

1.2.4 Diagnóstico del síndrome de Down.

Hay dos tipos de exámenes que pueden realizarse antes del nacimiento del bebé: los exámenes de detección y los exámenes de diagnóstico. Los exámenes prenatales evalúan las posibilidades de que el feto tenga síndrome de Down. Estos exámenes solo pronostican las probabilidades. Los exámenes de diagnóstico pueden proporcionar un diagnóstico definitivo con casi 100% de precisión.

La mayoría de los exámenes de evaluación requieren un análisis de sangre y una ecografía. Los exámenes del suero materno miden las cantidades de distintas sustancias en la sangre. Estos exámenes evalúan, junto con la edad de la mujer, sus probabilidades de tener un hijo con síndrome de Down. Por lo general, estos análisis de sangre se realizan junto con una ecografía detallada para buscar características relacionadas con el síndrome de Down.

Actualmente se utiliza una combinación de suero materno, ecografía y edad que puede brindar un índice de precisión mucho más elevado en una etapa temprana del embarazo. Aunque el examen no puede diagnosticar el SD de forma definitiva.

Los exámenes de evaluación prenatal se ofrecen ahora frecuentemente a mujeres de todas las edades. Si la posibilidad de tener un niño con síndrome de Down es alta a partir de la evaluación prenatal, los médicos generalmente recomiendan a la madre que se someta a un examen si desea un diagnóstico definitivo. Los procedimientos disponibles para el diagnóstico prenatal del síndrome de Down son: el muestreo de vellosidades coriónicas (CVS, Chorionic villus sampling) y la amniocentesis. Estos procedimientos, que conllevan hasta un 1% de riesgo de causar una interrupción del embarazo (aborto espontáneo), tienen casi un 100% de precisión en el diagnóstico del síndrome de Down. La amniocentesis generalmente se realiza durante el segundo trimestre, entre las semanas 15 y 22 de gestación, mientras que el CVS se realiza en el primer trimestre, entre las semanas 9 y 11.

Investigaciones recientes en el diagnóstico del SD prenatal se han centrado en la reducción del uso de las pruebas de diagnóstico invasivo como el muestreo de vellosidades coriónicas y la amniocentesis (Roizen y Patterson, 2003). Un pliegue nucal engrosado está presente en el 80-85% de los fetos con SD, aunque hay una tasa de detección de falsos positivos del 5% usando esta técnica (Roizen y Patterson, 2003). Con más de 15 semanas de gestación, el diámetro biparietal y la braquicefalia se pueden detectar en fetos con trisomía del 21 (Guihard-Costa *et al.*, 2006). La hipoplasia del tercio medio facial se puede detectar en los fetos con SD tan pronto como a finales del primer trimestre y principios del segundo (Dagklis *et al.*, 2006). El uso de ecografías han encontrado que los fetos con SD en el segundo trimestre suelen tener un ángulo facial frontomaxilar aumentado (Molina *et al.*, 2008). Durante el tercer trimestre, las dimensiones de las fontanelas anteriores son más grandes en los fetos con SD (Paladini *et al.*, 2007).

Generalmente, el síndrome de Down se identificaba al nacer por los rasgos físicos: escasa tonicidad muscular, pliegue único en la palma de la mano, perfil facial levemente achatado y ojos almendrados. Estos rasgos pueden aparecer en bebés sin síndrome de Down, por lo que se debe realizar un análisis cromosómico de cariotipo para confirmar el diagnóstico. Para confirmar el diagnóstico, también se puede realizar un examen genético tipo FISH.

1.2.5 Síndrome de Down en modelos experimentales.

Conociéndose la alteración genética responsable del síndrome y los genes afectados, se han desarrollado distintas estrategias para estudiar el efecto de la sobreexpresión de éstos. Los estudios se han centrado principalmente en generar animales transgénicos que tengan una copia extra de regiones del cromosoma 16 murino. Estos ratones muestran muchas de las características de los individuos con SD, como un retraso en la adquisición del número de funciones sensoriales y motoras (Costa *et al.*, 1999; Holtzman *et al.*, 1996), así como defectos en el aprendizaje y en la ejecución de tareas de memoria mediadas por el hipocampo (Escorihuela *et al.*, 1998, Holtzman *et al.*, 1996 y Reeves *et al.*, 1995), y déficits en la potenciación a largo plazo (LTP) (Kleschevnikov *et al.*, 2004).

El uso de modelos animales permite conocer de modo exhaustivo las alteraciones que provoca el exceso cromosómico. Los modelos animales para el SD representan además herramientas poderosas para el estudio del desarrollo temprano, la patología a nivel molecular y celular, o las alteraciones cerebrales observadas en el SD. Se han utilizado distintos tipos de modelos animales murinos, cuyas características presentan similitudes y diferencias respecto al SD en humanos.

Se han utilizado ratones con translocaciones parciales (o trisomías segmentales) del cromosoma 16 murino, concretamente de las zonas homólogas al cromosoma 21 humano, ya estos ratones no presentaban el problema de muerte temprana como otros modelos murinos. Debido al éxito de estos ratones, que llegaban a la edad adulta reproduciendo muchas de las alteraciones clínicas de los individuos con SD, se desarrollaron distintos modelos: Ts65Dn, Ts1Cje y Ms1Ts65 (figura 10). De éstos, el que mejor reproduce los síntomas es el Ts65Dn que muestra retraso en el desarrollo y anormalidades en diferentes órganos, entre ellos el cerebro donde se observó neurodegeneración y defectos de aprendizaje. Este modelo es el más utilizado para estudiar diversos aspectos de la patología, fundamentalmente a nivel cerebral.

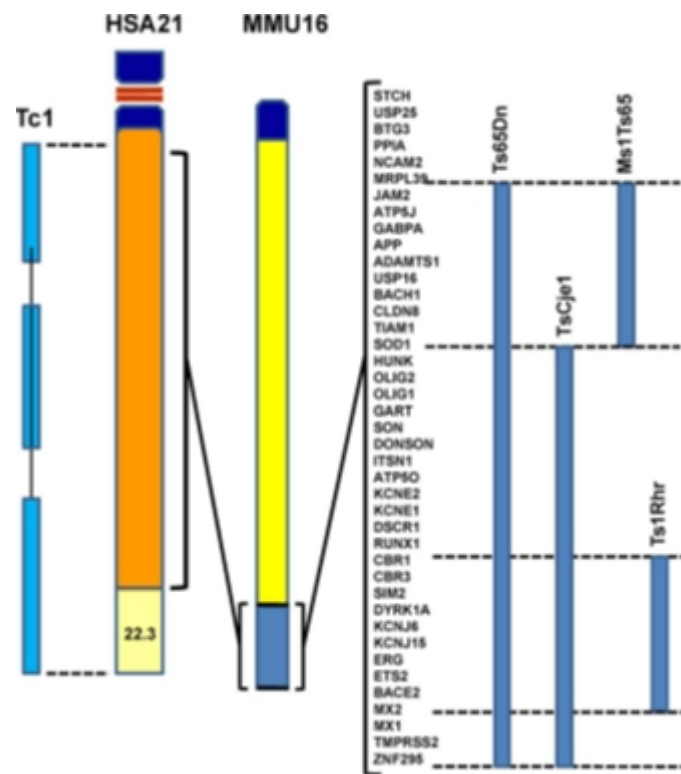


Figura 10. Esquema de los modelos murinos de SD más utilizados.

Se muestra la región homóloga del cromosoma 21 humano (Hsa21) al cromosoma 16 murino (Mmu16), con el que comparte el 80% de los genes. También se muestran las regiones del genoma en trisomía en cada uno de los modelos de ratones con trisomía parcial, como el Ts65Dn con el que comparte 104 genes, el TsCje1 con el que comparte 81 genes y el Ts1Rhr con el que comparte 71 genes (Hattori *et al.*, 2000).

El ratón Ts65Dn es un ratón mutante trisómico parcial para el segmento del cromosoma 16 murino (Mmu16) traslocado al Mmu17 que lleva genes del cromosoma 21 humano (Hsa21) del que es ortólogo (Davisson *et al.*, 1993). Esta trisomía parcial desde el extremo distal de Mmu16 corresponde a una porción del Hsa21 que abarca 15,6 Mb y contiene aproximadamente 108 genes (Reeves *et al.*, 2001). En particular, el ratón Ts65Dn lleva por triplicado una secuencia genómica de genes desde el *Mrpl39* al *Znf295* (Kahlem *et al.*, 2004) y contiene genes como *App*, *Sod1*, *Sim2* y *Mx1*. Estos heterocigotos resultantes, son capaces de producir descendencia con un pequeño cromosoma que consiste en la región telomérica de 12,4 Mb del Mmu16, que está unido a un centrómero Mmu17, con una pequeña cantidad de material eucromático presente (Davisson *et al.*, 1993; Lorenzi *et al.*, 2010).

Los ratones Ts65Dn tienen una vida larga, por lo tanto, pueden ser estudiados tanto durante el desarrollo embrionario y postnatal como en la edad adulta (Davisson *et al.*, 1993). Se encontró que los ratones Ts65Dn jóvenes eran de menor tamaño en comparación con los ratones controles (figura 11). A las 6 semanas de edad los ratones Ts65Dn muestran hiperactividad y temblor muscular, y a los 5-6 meses de edad, estos ratones tienden a convertirse en obesos y la hidrocefalia leve inicial se hace notable (Davisson *et al.*, 1993; Kola y Hertzog, 1998).

Las hembras Ts65Dn tienen menos crías que los controles (3-7 en lugar de 10-12) y aproximadamente el 20-40% de la descendencia son trisómicos, que es menor que el 50% esperado, pero debido a la muerte prematura durante desarrollo embrionario y en los primeros días postnatales de algunos de los animales trisómicos, la progenie trisómica se ve disminuida (Davisson *et al.*, 1993; Roper *et al.*, 2006), además presentan una mala atención hacia la prole. Las madres viejas Ts65Dn ven reducido el número de ratones con trisomía por camada a medida que envejecen (Roper *et al.*, 2006). Los ratones machos trisómicos son generalmente estériles, y los fértiles son muy raros y escasos, lo que impide el desarrollo de colonias estables, reduciendo el impacto de este modelo (Davisson *et al.*, 1993; Roper *et al.*, 2006). Sin embargo, en estudios recientes (Moore *et al.*, 2010) se han identificado y criado una selección de machos fértiles raros a partir de dos colonias de trabajo de ratones Ts65Dn, de esta manera, la descendencia trisómica puede ser propagada para producir grandes poblaciones de individuos hermanos estrechamente relacionados.



Figura 11. Comparación entre un ratón Ts65Dn y uno normal.

Se muestra la diferencia que existe entre los dos ratones adultos. El ratón de la derecha es normal y el de la izquierda pertenece a la línea experimental de SD Ts65Dn, y se aprecia claramente la diferencia de tamaño existente entre ambos (*Jackson Laboratory*).

Estudios realizados con el modelo Ts65Dn han encontrado paralelismos directos entre el fenotipo de SD en humanos y el fenotipo en el modelo de ratón como: defectos cardiovasculares y gastrointestinales estructurales (Li *et al.*, 2007). Defectos neurológicos que incluyen, comportamientos cognitivos deteriorados y una reducción de la potenciación a largo

plazo del hipocampo (Yu *et al.*, 2010). Deterioro de la memoria de trabajo y el déficit de la memoria a largo plazo, probablemente asociadas a una pérdida de neuronas colinérgicas, retraso en el desarrollo, un menor peso corporal, disfunción de habilidades motoras, disminución de la respuesta al dolor e hiperactividad (Gardiner y Davisson, 2000). Reducción de la plasticidad sináptica y del número de neuronas cerebelosas (Kleschevnikov *et al.*, 2004). Reducción del volumen del cerebelo y reducción en la densidad de células granulares y de Purkinje (Baxter *et al.*, 2000; Olson *et al.*, 2004.) debido a la reducción de la respuesta mitogénica a la proteína de señalización Hedgehog (Roper *et al.*, 2006). Alteración de la neurogénesis por un reducido número de células en proliferación del giro dentado y de los ventrículos laterales durante el desarrollo embrionario, que también fue encontrado en fetos humanos (Contestabile *et al.*, 2007). Deficiencias en la formación del hueso resultando en una menor densidad mineral ósea del hueso trabecular y cortical, indicando una reducción de la actividad de los osteoblastos y odontoblastos (Blazek *et al.*, 2010). Braquicefalia, reducidas dimensiones de las bóvedas faciales y craneales en el tercio medio facial, maxilar, mandíbula general y la rama mandibular, amplitud interorbitario, y tamaño occipital (Richtsmeier *et al.*, 2000; Richtsmeier *et al.*, 2002).

El ratón Ts65Dn muestra varias alteraciones de comportamiento similares a los observados en personas con síndrome de Down. De hecho, estos ratones tienen déficits en el aprendizaje espacial y la memoria (Reeves *et al.*, 1995; Demas *et al.*, 1996, 1998) y un comportamiento agresivo y sexual alterados (Klein *et al.*, 1996.). Las diferencias en el comportamiento agresivo y durante el apareamiento son indicativos de los déficits en la conducta adaptativa, y en personas con síndrome de Down se ha visto que tienen también una variedad de déficits conductuales adaptativos (Collacott, 1993). Estas deficiencias en el comportamiento agresivo y durante el apareamiento de los ratones Ts65Dn no parecen ser debidos a déficits sensorimotors (Klein *et al.*, 1996). Se ha sugerido que estos ratones pueden servir como un modelo animal útil para el estudio de otras anomalías de comportamiento asociado con el síndrome de Down, tales como deficiencias de aprendizaje y memoria (Escorihuela *et al.*, 1995; Reeves *et al.*, 1995; Demas *et al.*, 1996).

Es importante señalar que los ratones Ts65Dn son trisómicos para sólo aproximadamente la mitad de los genes ortólogos en el Hsa21 (Gardiner y Davisson, 2000). Es probable que los genes que faltan desempeñen un papel en la reproducción del fenotipo SD en los humanos, y es difícil determinar cómo la falta de estos genes en este modelo de ratón afecta al fenotipo resultante. Por otra parte, los genes que están triplicados pueden interactuar de manera diferente que si todos los genes ortólogos se triplicaran, de nuevo posiblemente causando diferencias fenotípicas y de desarrollo. El efecto fenotípico y de desarrollo de estos genes y cómo estos genes interactúan con otros genes triplicados es desconocido. Por estas razones, algunos investigadores son críticos acerca de lo buen modelo del ratón Ts65Dn

reproduce las condiciones del SD en los seres humanos (Shapiro, 2001). Sin embargo, hay que destacar que este fue el mejor modelo de ratón posible viable segmentariamente trisómico de SD disponible actualmente.

Usando el modelo de ratón Ts65Dn, que es trisómico para aproximadamente 108 genes cuyos ortólogos se encuentran en el Hsa21 (Davisson *et al.*, 1993; Reeves *et al.*, 1995). Kahlem *et al.* (2004) cuantificó los niveles de transcripción y encontró que los genes triplicados se expresaban alrededor de 1,5 veces más, sin embargo, algunos genes se desvían de este patrón, lo que indica que los mecanismos reguladores específicos de tejido adicional son en efecto para algunos genes triplicados. Resultados similares han sido encontrados por otros investigadores (Sultan *et al.*, 2007; Prandini *et al.*, 2007).

2. EL ZINC Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Tras el hierro, el zinc es el oligoelemento más abundante en el sistema nervioso (Paoletti *et al.*, 2009). Con una concentración en cerebros de mamíferos de entre 120-150 μM (Ebadi *et al.*, 1994; Wallwork, 1987) y de entre 100-500 μM en cantidad total de zinc celular (Eide, 2006). El zinc forma parte de muchas proteínas, más de 300 enzimas y 2.000 factores de transcripción, y es esencial para el correcto funcionamiento de multitud de funciones y procesos celulares (Takeda, 2000; Jeong y Eide, 2013).

A nivel extracelular encontramos zinc asociado principalmente a metaloproteínas y factores de crecimiento, e intracelularmente encontramos zinc unido a una gran variedad de enzimas citoplasmáticas e incluso en el interior del núcleo, a enzimas para la replicación transcripción y reguladores transcripcionales (Coleman, 1992; Vallee *et al.*, 1991).

Además, encontramos zinc iónico libre que, como el calcio, interacciona con muchas enzimas, pudiendo actuar como segundo mensajero activando/inhibiendo importantes procesos celulares como la apoptosis (Fraker y Telford, 1997).

La homeostasis del zinc es muy importante, porque el zinc interactúa con los receptores extracelulares de GABA y NMDA, regulando su actividad inhibitoria y excitadora (Grauert *et al.*, 2014; Sirrieh *et al.*, 2013). Además el zinc iónico puede almacenarse en las vesículas sinápticas en algunos tipos neuronales junto con el neurotransmisor como en el caso de las neuronas enriquecidas en zinc (Frederickson, 1989).

A pesar de la labilidad del zinc y de las fuertes interacciones con una gran variedad de proteínas, es posible detectarlos por medio de métodos histoquímicos. Las técnicas de análisis histoquímico convencionales son capaces de detectar sólo una pequeña parte de este zinc, el llamado zinc iónico detectable, que en el cerebro se estima alrededor de un 10-15% (Levenson y Tassabehji, 2007).

El cerebro de mamíferos presenta algunas áreas con una elevada concentración de este zinc iónico. Estas zonas se han identificado utilizando técnicas de precipitación y amplificación autometalográficas (Danscher, 1982; López-García *et al.*, 1984). Se ha descrito la presencia de zinc en el hipocampo (Slomianka, 1992), neo-cortex (Perez-Clausell, 1996), cortex piriforme (Friedman y Price, 1984), complejo amigdalino (Mizukawa *et al.*, 1989), estriado (Mengual *et al.*, 1995), en el tálamo (Mengual *et al.*, 2001) y septum (Haug, 1973). También se ha detectado su presencia fuera del telencéfalo, como en la médula espinal (Danscher *et al.*, 2001), en bulbo olfativo (Jo *et al.*, 2002) y en el cerebelo (Wang *et al.*, 2002).

En todas estas áreas, el zinc aparece en los terminales sinápticos, en la mayoría de las zonas excitadoras junto al glutamato (Crawford, 1983; Martínez-Guijarro *et al.*, 1991) pero también en algunas zonas inhibitoras, junto al GABA (Danscher *et al.*, 2001).

2.1 Localización del zinc.

La distribución de zinc en el cerebro es heterogénea y se puede clasificar según su localización en dos compartimentos: estructural y lábil (figura 12).

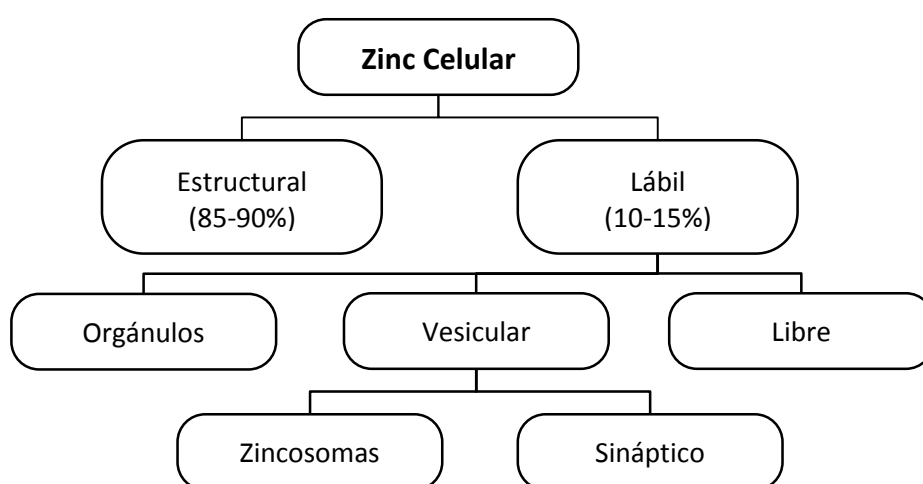


Figura 12. Distribución del zinc.

El zinc celular se puede localizar en dos compartimentos principalmente, el estructural y el lábil o detectable. A su vez el zinc lábil en el SNC se puede encontrar contenido en vesículas y orgánulos o de forma libre, aunque en muy baja proporción. Y el zinc contenido en vesículas puede ser de dos tipos fundamentalmente, contenido en vesículas sinápticas y en vesículas contenedoras de zinc o zincosomas.

Del zinc celular total, entre el 85-90% es de tipo **estructural o metabólico**, por lo que se encuentra fuertemente unido a proteínas (Vallee y Auld, 1993) o ácidos nucleicos (Fuwa *et al.*, 1960) mediante enlaces covalentes. Una fracción de este zinc estructural o metabólico es el zinc ligado a proteínas de bajo peso molecular por enlaces débiles, como las metalotioneínas (MT). El resto del zinc (10-15%) es una fracción muy **lábil** que se encuentra en estado iónico y es especialmente abundante en corteza cerebral, hipocampo y amígdala. De estos dos compartimentos, solo el segundo es detectable mediante técnicas histoquímicas clásicas.

El zinc **histoquímicamente detectable** es sensible a la extracción con quelantes, por lo tanto es zinc iónico. Un tipo de este zinc iónico es el de tipo **vesicular**, el cual se localiza en el interior de compartimentos membranosos (como vesículas sinápticas, lisosomas, mitocondrias o cisternas citosólicas). Un tipo especializado de vesícula de tipo lisosomal son los denominados “**zincosomas**” (Beyersmann y Haase, 2001), los cuales son utilizados por las células para almacenar y confinar los iones zinc extracelulares tras su captura. Los zincosomas se han

detectado en muchos tipos celulares, incluyendo las levaduras (Eide, 2006). Aunque su naturaleza todavía no está clara, parece estar relacionada con la actividad endocítica (Varea *et al.*, 2006) la cual, puede estar alterada por el efecto del alcohol (Ballestín *et al.*, 2011).

La fracción más importante del **zinc vesicular** es el **zinc sináptico** (Frederickson y Danscher, 1990), que se caracteriza por localizarse fundamentalmente en el interior de vesículas sinápticas y que puede verterse en la hendidura sináptica junto con el neurotransmisor durante la transmisión sináptica (Karol *et al.*, 2010). Este zinc sináptico es característico de una subpoblación de neuronas, las neuronas enriquecidas en zinc (*ZEN*, *zinc-enriched neurons*) (Frederickson, 1989) formado por un subgrupo de neuronas glutamatérgicas (excitadoras) dentro del SNC. Estudios estructurales han demostrado la presencia de zinc sináptico en los terminales excitadores junto al glutamato en el interior de vesículas sinápticas (López-García *et al.*, 1984; Danscher, 1984; Pérez-Clausell y Danscher, 1985).

También se han caracterizado neuronas GABAérgicas que poseen zinc en sus terminales sinápticos. Estas neuronas se localizan en la médula espinal y en el cerebelo (Danscher *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). También se ha demostrado la presencia de neuronas enriquecidas en zinc en el SNP (Wang *et al.*, 2002). Conociéndose, por lo tanto, una diversidad creciente de neuronas enriquecidas en zinc.

La acumulación del zinc en las vesículas sinápticas de las neuronas enriquecidas en zinc se realiza mediante un transportador de membrana específico denominado ZnT3 (Palmiter *et al.*, 1996; Wenzel *et al.*, 1997).

Durante la activación neuronal, la depolarización de las neuronas provoca la entrada de calcio al citoplasma y éste altera la función de las proteínas sinápticas induciendo la exocitosis de las vesículas sinápticas. El zinc presente en las vesículas sinápticas, se libera a la hendidura sináptica junto con el glutamato (Lee *et al.*, 2012) donde actúa sobre los receptores sinápticos como el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), ácido γ -aminobutírico (GABA), receptores implicados en la plasticidad sináptica y consolidación de la memoria (Sindreu y Storm, 2011), canales iónicos dependientes de voltaje (VGCC) principalmente del hipocampo (Frederickson *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 2006; Smart, 2004; Takeda *et al.*, 2004) y transportadores que regulan rutas de señalización y procesos neuronales como: el correcto disparo de las neuronas, la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) (Takeda y Tamano, 2012).

Este proceso de liberación de zinc se puede modular experimentalmente, la eliminación del calcio extracelular inhibe la liberación de zinc de las vesículas sinápticas (Howell *et al.*, 1984), y por el contrario, la adición de una sustancia depolarizante, como una concentración

elevada de potasio, incrementa la liberación de zinc contenido en las vesículas sinápticas (Budde *et al.*, 1997).

El resto del zinc histoquímicamente detectable, que no se localiza en el interior de compartimentos membranosos, es el denominado **zinc libre**. Este zinc posiblemente se encuentre en tránsito entre los distintos compartimentos anteriores.

2.2 Funciones del zinc.

Las funciones que el zinc desempeña en los sistemas biológicos se pueden dividir principalmente en tres categorías:

El **zinc estructural** es el que participa en el plegamiento de las proteínas y la estabilización de macromoléculas, produciendo moléculas activas y funcionales tales como por ejemplo, los llamados dedos de zinc (*zinc fingers*) (Wang *et al.*, 2014). También se encargaría de estabilizar algunas enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) (Roberts *et al.*, 2007). El **zinc catalítico** es un componente fundamental de cientos de metaloenzimas, incluyendo las carboxipeptidasas pancreáticas, la anhidrasa carbónica, la fosfatasa alcalina, la ARN polimerasa, y la alcohol deshidrogenasa (Vallee y Falchuck, 1993), y sin el cual no serían funcionales. El **zinc regulador** actúa en una serie de procesos biológicos, incluyendo la regulación génica y, por ejemplo, la expresión de proteínas metalotioneínas tamponadoras de zinc (Cousins, 1994; Dalton *et al.*, 1997). El zinc presente en los tejidos, se distribuye entre las células y los compartimentos celulares de acuerdo con las necesidades de éstas, y con el fin de mantener la homeostasis del zinc (Sekler *et al.*, 2007).

Otra posible función es que el zinc actúe como **señalizador** en el medio extracelular alterando el comportamiento de varios canales y receptores de membrana ejerciendo un efecto balsámico protector para evitar la excitotoxicidad tras el impulso nervioso (Smart *et al.*, 1991; Harrison y Gibbon, 1994) modulando así la transmisión sináptica. Concentraciones fisiológicas de zinc reducen la activación producida por el glutamato sobre receptores NMDA; y activan receptores AMPA/KA (Westbrook y Mayer, 1987; Peters *et al.*, 1987). El zinc también inhibe la respuesta de los receptores GABA_A en neuronas del hipocampo (Westbrook y Mayer, 1987), reduciendo la probabilidad de apertura del canal (Smart, 1992) ya que la subunidad γ del receptor GABA_A es sensible a zinc. El zinc varía la constante de afinidad de los receptores GABA y glutamato (Legendre y Westbrook, 1990).

El zinc iónico altera el comportamiento de otros canales iónicos, como los canales de sodio que son sensibles a la presencia de zinc (White *et al.*, 1993). El zinc iónico también es capaz de inhibir los canales de calcio dependientes de voltaje (Akaike *et al.*, 1989; Winegar y Lansman, 1990).

Mediante manipulación genética se han obtenido ratones a los que se les ha eliminado el gen ZnT3, y que carece de zinc histoquímicamente detectable en los terminales sinápticos (Cole *et al.*, 1999). Esto provoca un descenso en la cantidad del zinc en el hipocampo de hasta un 20%. Aunque son animales que muestran unas habilidades y comportamientos similares a los animales control (Cole *et al.*, 2001), presentan una sensibilidad mayor a la lesión inducida por agentes depolarizantes (Cole *et al.*, 2000).

Estos efectos confirman un papel tónico y neuromodulador del zinc iónico sobre el elemento postsináptico durante la transmisión sináptica (Mayer *et al.*, 1989).

El zinc también ejerce una función extracelular sobre factores de crecimiento y modulando el efecto de algunos receptores. Este zinc es regulado por las metalotioneínas que las células liberan al espacio extracelular.

2.3 La histoquímica del zinc.

El zinc que puede ser detectado mediante técnicas histoquímicas, es el denominado zinc histoquímicamente detectable o lábil, y supone una fracción pequeña de la cantidad de zinc total de la célula (10-15%). El resto de formas en las que se encuentra el zinc, unido a proteínas, a enzimas, o a ácidos nucleicos o mediante uniones covalentes, no es histoquímicamente detectable.

El uso de sustancias que dan color o que emiten fluorescencia cuando entran en contacto con los iones metálicos divalentes se utilizan para detectarlos dentro de las células; son los llamados “métodos directos”. La fijación y la precipitación de los iones metálicos en forma de precipitados de sales insolubles, su mantenimiento durante el proceso histológico, y su demostración después del revelado autometalográfico son pasos esenciales para otros métodos, los llamados “métodos indirectos” (métodos de Timm y Danscher Neo-Timm).

Los métodos directos pueden ser utilizados *in vivo* y para propósitos cuantitativos/microanalíticos, aunque por lo general no permiten una buena conservación histológica. Los métodos indirectos por contra, aunque no son muy adecuados para la cuantificación, son mucho más sensibles y compatibles con la microscopía óptica y electrónica.

2.3.1 Métodos fluorescentes.

Algunos compuestos fluorescentes emiten luz solo después de unirse a iones metálicos específicos. La mayoría de estos marcadores fluorescentes son liposolubles, atraviesan la membrana celular y se unen a los iones metálicos en condiciones “fisiológicas” (es decir, pH,

temperatura, fuerza iónica, etc). Por lo tanto, pueden ser usados *in vivo* y son adecuados para estudios cuantitativos.

Existen marcadores fluorescentes para gran cantidad de iones intracelulares, como calcio, magnesio (Hinkle *et al.*, 1992) y también hierro, cobre, níquel, mercurio, plomo, cadmio y cobalto (Cabantchik *et al.*, 1996). Pero, una característica compartida por estos marcadores fluorescentes es la falta de una clara especificidad para un ion metálico en particular.

Uno de los marcadores más utilizados para la detección del zinc iónico en el tejido nervioso ha sido el TSQ (N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide) (Frederickson *et al.*, 1987). El TSQ es liposoluble, atraviesa las membranas celulares, y reacciona formando complejos estequiométricos de zinc iónico en proporción 2:1 (figura 13). Además, el TSQ reacciona con metaloproteínas de unión a zinc formando complejos 1:1 (Prat *et al.*, 1991.). El TSQ también puede reaccionar con iones magnesio, calcio y cadmio (Prat *et al.*, 1991). Cabe destacar que, en el tejido nervioso, el compartimento de zinc detectable con TSQ es el mismo que el detectado con ditizona (Frederickson *et al.*, 1987, 1989).

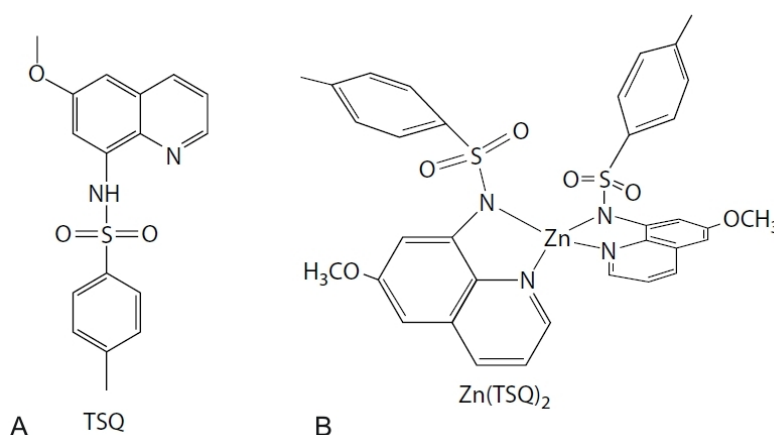


Figura 13. Estructura molecular del fluorocromo TSQ.

Comparación de la estructura molecular del marcador fluorescente TSQ aislado (A) y del complejo TSQ-zinc mostrando una relación estequiométrica de 2:1 (B) (Zalups y Koropatnick, 2010).

También son utilizados para la detección del zinc iónico otros fluorocromos (tabla 8) como puedan ser: el Zinquin, el FluoZin-1, FluoZin-2, FluoZin-3, RhodZin-3 o el Newport Green DCF. El Zinquin posee una alta afinidad por el zinc en células vivas (Tsuda *et al.*, 1997). El FluoZin-1 y FluoZin-2 son usados para mediciones de altas concentraciones de zinc. El FluoZin-3 se usa en rangos amplios de concentraciones de zinc y es el más sensible de los tres miembros. El RhodZin-3 se utiliza como marcador de zinc en mitocondrias y es insensible a los cambios de pH. El Newport Green DCF es un marcador insensible a la concentración de calcio.

Marcadores fluorescentes para el zinc		
Marcador	Ex/Em (nm)	K _d (Zn ²⁺)*
Fluozin-3 AM	494/516	15 nM
Newport Green	505/535	1 μM
TSQ	360/420	10 nM

Tabla 8. Marcadores fluorescentes para el zinc.

Se muestran los marcadores para el zinc más utilizados con sus respectivos valores de longitud de onda de excitación y emisión, y sus constantes de afinidad por el zinc. *Constante de disociación del complejo marcador/Zn²⁺ medido en MOPS 50 mM pH 7,0 a 22°C (*Life Technologies*).

2.3.2 Métodos colorimétricos.

La **ditizona** (1,5-difeniltiocarbazona) fue el primer método desarrollado para la detección histoquímica del zinc. Se utiliza tanto en células eucariotas como en procariotas. Es un quelante de metales pesados ampliamente usado en química analítica. Es un compuesto de color verdoso, soluble en la mayoría de disolventes orgánicos no polares e insoluble en agua por debajo de pH 7. La ditizona quela iones zinc, manganeso, hierro, cobre, níquel, cadmio, plomo, plata y mercurio. Al aplicar ditizona a las células, éstas forman complejos hidrófobos tras la unión con la mayoría de los complejos metálicos divalentes y trivalentes. Su unión con los distintos metales da lugar a una coloración rojo brillante debido a la formación del complejo zinc-ditizona (Maske, 1955; Fleischhauer y Horstmann, 1957).

Los complejos zinc-ditizona son solubles en lípidos y su marcaje es transitorio. Además, una gran cantidad de iones metálicos permanecen en el tejido y no pueden ser extraídos, ni por la ditizona ni por otros quelantes como el DEDTC (dietil ditiocarbamato).

2.3.3 Autometalografía del zinc.

Como se ha comentado anteriormente, los métodos indirectos requieren principalmente que los iones metálicos sean precipitados como nanocristales insolubles. El primer método fiable para la detección histoquímica de zinc y metales pesados fue desarrollado por Timm (1958). Una premisa del método autometalográfico es que el zinc presente en las células se encuentre en forma iónica, ya que la mayoría del zinc detectable se acumula en vesículas, como vesículas sinápticas, vesículas secretoras y lisosomas. Los dos métodos ampliamente utilizados para realizar esta tarea han sido: la adición de iones sulfuro en el fijador (métodos Timm y Neo-Timm) o la adición de iones selenio (método Danscher selenito) *in vivo* inmediatamente antes de la fijación. Es muy importante que ambos precipitados de nanocristales de sulfuro o de selenio permanezcan insolubles durante el proceso histológico. Entonces partículas del

nanocristal de metal en secciones de tejido son reveladas por autometalografía. Las ventajas de esta técnica son: la alta sensibilidad, la localización precisa y la posibilidad de determinar el metal que se está amplificando (Danscher y Stoltenberg, 2006).

La autometalografía de plata se basa en el depósito de plata metálica en la superficie del nanocristal metálico y así formar parte de él, reduciéndose los iones plata de la solución al capturar los electrones liberados por la hidroquinona, de esta manera se forma un cristal metálico que va aumentando de tamaño progresivamente con el tiempo mientras haya disponibilidad de plata iónica e hidroquinona en la solución. Esta envoltura de plata metálica alrededor del centro catalítico; crece hasta que pueda ser detectado por microscopía óptica o electrónica. Se ha calculado que un sólo átomo de oro, dos átomos de plata, y dos o tres átomos de zinc son necesarios para actuar como centro catalítico autometalográfico. Por otro lado, los depósitos de sulfuro (Timm, 1958), complejos de selenio (Danscher, 1982), oro, mercurio, plata metálica (Danscher *et al.*, 1994), e incluso los grupos SH de las proteínas pueden actuar como centros catalíticos para la autometalografía.

Aunque el método de Timm no es específico para un ion metálico definido, el uso de diferentes tratamientos de las muestras con ácido (disolviendo nanocristales de un metal en particular) lo hacen adecuado para estudios microscópicos de zinc, hierro y cobre (Kozma *et al.*, 1981).

Modificaciones de la técnica original de Timm han permitido el estudio del zinc en biopsias de cerebros humanos mediante detección autometalográfica (Jaarsma y Korf, 1990).

El uso de diferentes soluciones, como el glutaraldehído saturado con sulfuro (Grzybek *et al.*, 1990) o una perfusión inicial con una solución de sulfuro sódico antes del glutaraldehído (Osborne, 1998), así como mejoras en la mezcla reveladora (Danscher y Zimmer, 1978) han permitido que el revelado de Timm sea adecuado para los estudios de microscopía electrónica. Así, se localizaron gránulos autometalográficos de plata electrodensos dentro de las vesículas sinápticas de las neuronas del hipocampo de rata (Haug, 1967). Y más tarde este hallazgo fue confirmado con el método sulfhídrico-osmio (López-García *et al.*, 1984) y el método Neo-Timm (Pérez-Clausell y Danscher, 1985).

A) Método de Neo-Timm.

Uno de los inconvenientes más comunes del método de Timm eran los derivados de la sobrefijación con iones sulfuro, que podían inducir a un exceso de grupos SH en las proteínas, quelando los iones de plata del revelador y actuando como centros catalíticos autometalográficos. Bajo estas condiciones, se producían falsos positivos de depósitos de plata.

El uso de cantidades ajustadas (suficiente, pero no excesiva) de iones sulfuro durante la fijación es de gran importancia para un correcto revelado autometalográfico. El hecho de que la ditizona (y otros agentes quelantes de iones metálicos) prevengan de la tinción de Timm en el hipocampo (Haug y Danscher, 1971) se ha utilizado para calcular la cantidad correcta de iones sulfuro durante la fijación: la cantidad máxima de iones sulfuro que pueden precipitar el zinc iónico sin provocar la aparición de falsos positivos, fue calculado por Danscher (1981) en un estudio en el que utilizaba una nueva mezcla de revelado, con lactato de plata sustituyendo el nitrato de plata, un pH controlado, y una concentración baja de hidroquinona, y es lo que hoy se conoce como el método Neo-Timm.

En el hipocampo de mamíferos, la ditizona y el método Neo-Timm marcan el mismo compartimento de cationes metálicos (Frederickson y Danscher, 1988), aunque este último tiene una mayor sensibilidad. Además, el método Neo-Timm también proporcionó una ubicación clara de gránulos de plata dentro de las vesículas sinápticas o en la hendidura sináptica después de la inducción de exocitosis de vesículas (Pérez-Clausell y Danscher, 1985). Por otro lado, el método Neo-Timm se ha utilizado en combinación con estudios de microscopio electrónico (López-García y Martínez-Guijarro, 1988) y con técnicas inmunocitoquímicas (De Biasi y Bendotti, 1998). Finalmente, el método Danscher Neo-Timm se ha utilizado en estudios cuantitativos (Martínez-Guijarro *et al.*, 1987).

B) Método del Selenio.

En este método, es el selenio en vez de los iones de sulfuro el que genera el precipitado de los cationes metálicos. Los precipitados de nanocristales metálicos por selenio pueden ser revelados por autometalografía en tejidos utilizando la solución de revelado del método Neo-Timm. Está aceptado que en el tejido nervioso, el revelado de zinc por el método del selenio es equivalente al marcaje por la ditizona o por el método Neo-Timm (Danscher, 1982).

Los precipitados de nanocristal de metal por selenio son mucho más estables que los de sulfuro; esto facilita el procesamiento histológico de las muestras. Sin embargo, los compuestos de selenito muestran una toxicidad diferencial en animales de experimentación, por lo que es necesario encontrar la concentración y tiempo correctos para su administración. A veces, las dosis de selenito inapropiadas pueden provocar artefactos (Howell *et al.*, 1989) o incluso la precipitación incompleta de iones metálicos en estructuras que contienen grandes cantidades de iones metálicos.

C) Método del Sulfhídrico-Osmio.

Cuando los iones metálicos se fijan con soluciones de glutaraldehído con sulfuro, los precipitados de sulfuro de zinc se pueden mejorar mediante el uso de tetróxido de osmio. Este procedimiento, conocido como el método de sulfhídrico-osmio, crea precipitados electrodenso de zinc visibles al microscopio electrónico (López-García *et al.*, 1984). Las partículas de sulfuro de zinc pueden atrapar el osmio durante la postfijación de una manera similar a la de autometalografía, aunque esto sólo se produce en condiciones de pH ácidos (es decir, solución acuosa, recién preparada de tetróxido de osmio al 2% durante 2 horas en la oscuridad). La postfijación con osmio en condiciones neutras (solución de osmio tamponada con fosfato) impide el depósito de osmio sobre los cristales de zinc-sulfuro.

El método del sulfhídrico-osmio proporciona una muy buena conservación ultraestructural de los tejidos. Por otro lado, el tamaño de los depósitos de sulfuro-zinc-osmio es lo suficientemente bajo como para no ocultar otras estructuras subyacentes, por lo que es posible detectar el precipitado adherido a la cara interna de la membrana de los compartimentos vesiculares (como vesículas sinápticas), que tienen un pH ácido en células vivas.

Los precipitados de sulfuro-zinc-osmio son muy pequeños en tamaño y son adecuados para estudios estereológicos cuantitativos sobre la distribución de zinc vesicular (Sánchez-Andrés *et al.*, 1997). Estos métodos eliminan parcialmente los problemas introducidos por el método de autometalografía, es decir, mediciones del tamaño y densidad de los depósitos de plata en lugar de la partícula de nanocristal de zinc adecuada.

Cualquier precipitado electrodenso de sulfuro-zinc-osmio colocaliza con los granos de plata generados por el revelado de Timm y Neo-Timm. De hecho, cuando se procesan rebanadas de tejido con el revelado de Danscher seguido de postfijación con osmio en condiciones ácidas, es posible observar gránulos de plata y precipitados electrodenso en las mismas estructuras.

2.4 La homeostasis del zinc.

El mantenimiento de la homeostasis del zinc es un proceso crucial para la célula dado el elevado número de procesos y moléculas en los que el zinc se encuentra implicado y asociado. Por este motivo, el estudio de los mecanismos de movilización de zinc, vías de entrada y distribución intracelulares resulta de gran interés.

La homeostasis del zinc citoplásmico viene regulada por los sistemas de **bombeo** existentes (hacia el exterior de las células y hacia el interior de los orgánulos) y la presencia de **proteínas** capaces de unir iones zinc y eliminarlos del citoplasma (metalotioneínas). En las

neuronas, el zinc tiene un doble papel neurotrófico y neurotóxico; así a elevadas concentraciones se induce la muerte celular por necrosis desencadenada por radicales libres, este efecto puede paliarse utilizando antioxidantes (Kim *et al.*, 1999). Estos efectos son similares a los producidos tras un incremento en la concentración de calcio intracelular. De igual manera, altas concentraciones de zinc en el citoplasma provocan la acidificación de las células. Tanto la acidificación como la generación de radicales libres pueden reducirse añadiendo quelantes de zinc capaces de atravesar membranas, como el TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil)etilenediamina) (Dineley *et al.*, 2002; Canzoniero *et al.*, 2003). Pero a bajas concentraciones es capaz de inhibir la apoptosis inducida por privación de suero en cultivos de neuronas (Frederickson *et al.*, 2005; Chen y Liao, 2003).

La generación de niveles alterados en las concentraciones de zinc pueden ser consecuencia o síntoma de patologías cerebrales (Flynn *et al.*, 1981; Suh *et al.*, 2000).

2.4.1 Transportadores.

Los transportadores son proteínas de membrana con una alta afinidad y especificidad por el zinc, y con la capacidad de traslocarlo a través de la membrana. Existen 2 familias de transportadores que se encargan de mantener la homeostasis del zinc iónico celular principalmente, ejerciendo su función en sentidos opuestos.

1) ZnT (familia SLC30).

La familia de transportadores específicos para zinc, los denominados **ZnT** (Palmiter y Findley, 1995) (tabla 9), poseen 6 segmentos transmembrana donde los extremos amino- y carboxilo-terminal se localizan en el interior de la célula y funcionan en antiporte (transportan cationes en direcciones opuestas, intercambiando protones por iones zinc). La función principal de estos transportadores es la de eliminar el zinc iónico del citoplasma, ya sea expulsándolo al exterior celular o introduciéndolo en el interior de diversos compartimentos membranosos intracelulares. Esta familia está compuesta por 10 miembros (ZnT1-10), cuya función se detalla a continuación:

- El **ZnT1** es el principal responsable de la homeostasis citoplásmica del zinc, se encarga de movilizar el zinc iónico desde el citoplasma al medio extracelular (Palmiter y Findley, 1995). Este transportador mantiene los niveles de zinc iónico en el citoplasma entre 100-500 μM . Se distribuye ubicuamente en todos los tejidos animales. La expresión del gen que codifica para esta proteína se encuentra regulada por la dieta, a mayor concentración de zinc presente en el citoplasma mayor cantidad de ARNm (Liuzzi *et al.*, 2001). El promotor de este

gen posee una secuencia a la que se une el factor de transcripción sensible a metales (MTF-1) y la unión del zinc iónico a este factor provoca un aumento en los niveles de transcripción del gen (Radtke *et al.*, 1993).

- El **ZnT2** es un transportador homólogo a ZnT1 (Palmiter *et al.*, 1996). Se localiza en la membrana de las vesículas y se encarga de eliminar el exceso de zinc citoplásmico y acumularlo en compartimentos vesiculares, alcanzando concentraciones bastante elevadas en células del intestino, riñón, placenta, glándula mamaria y testículos. De esta forma se evitan los posibles efectos de un exceso de zinc en el citoplasma de la célula. Su expresión es dependiente de los niveles de zinc. En ratas alimentadas con una dieta deficiente en zinc se observa una marcada reducción de la expresión de este gen tanto en el intestino delgado como en los riñones (Liuzzi *et al.*, 2001).

- El **ZnT3** es un transportador que se localiza en la membrana de las vesículas y es el responsable de la acumulación de zinc en las vesículas sinápticas. Únicamente se expresa en el cerebro y testículos (Palmiter *et al.*, 1996), siendo muy abundante en zonas ricas en zinc del SNC como el hipocampo y la corteza cerebral. La concentración de zinc en el interior de las vesículas se debe únicamente a la presencia y cantidad de este transportador. En ratones manipulados genéticamente, en los cuales se ha eliminado el gen que codifica para esta proteína, se ha visto que provoca que estos ratones carezcan de zinc en las vesículas sinápticas de sus neuronas (Cole *et al.*, 1999).

- El **ZnT4** se expresa en las glándulas mamarias, el epitelio intestinal, y el cerebro (Huang y Gitschier, 1997; Murgia *et al.*, 1999; Liuzzi *et al.*, 2001). Su deficiencia se ha relacionado con el síndrome de la leche letal (Huang y Gitschier, 1997) en la cual, la leche materna contiene aproximadamente la mitad de la cantidad de zinc normal y las crías mueren tempranamente por un déficit de zinc (Ackland y Mercer, 1992). También se expresa en el aparato de Golgi y en compartimentos vesiculares, facilitando la carga de zinc a las vesículas de secreción de glándulas como las mamarias y las submaxilares.

- El **ZnT5** se encuentra ubicuamente expresado pero con una abundancia mayor en el páncreas. Este transportador está asociado con los gránulos secretorios de insulina, que están enriquecidos en zinc y se localizan en las células β pancreáticas (Kambe *et al.*, 2002). Su expresión es dependiente de los niveles de zinc. Este transportador es necesario para la maduración de los osteoblastos y para el mantenimiento de la función normal del corazón (Inoue *et al.*, 2002).

- El **ZnT6** facilita la translocación de zinc desde el citoplasma a la red trans del aparato de Golgi y a otros compartimentos vesiculares (Huang *et al.*, 2002). La localización subcelular de este transportador viene determinada por la concentración de zinc extracelular. En ocasiones

interactúa con el ZnT5 para transportar zinc a la ruta secretora (Ellis *et al.*, 2005). Las concentraciones extracelulares elevadas de zinc inducen el paso de ZnT6 desde la red trans Golgi al compartimento vesicular (Huang *et al.*, 2002).

- El **ZnT7** almacena zinc en el aparato de Golgi, se expresa en el intestino delgado y los pulmones, y participa en la absorción de zinc en el intestino (Kirschke y Huang, 2003).

- El **ZnT8** se encarga de almacenar zinc junto con la insulina en vesículas de exocitosis a razón de 2 iones zinc/hexámero de insulina en las células secretoras del páncreas, que serán vertidas a la circulación sanguínea tras recibir el estímulo externo de bajos niveles de glucosa en sangre (Qian *et al.*, 2000).

- El **ZnT9** se expresa en células pulmonares pero se desconoce su función (Sim y Chow, 1999).

- El **ZnT10** es un transportador que se ha localizado en el aparato de Golgi y que tras un dosis de zinc, este se trasloca a la membrana plasmática. Sus funciones están por determinar, pero se ha visto alterado en la enfermedad de Alzheimer, donde tanto los niveles de proteína como de RNAm se encuentran reducidos (Bosomworth *et al.*, 2004), estando relacionado con los elevados niveles de zinc en el Alzheimer (Cornett *et al.*, 1998).

Transportadores ZnT			
Gen	Proteína	Distribución Tejido	Localización subcelular
SLC30A1	ZnT1	Generalizado	Membrana plasmática
SLC30A2	ZnT2	Glándula mamaria, próstata, retina, páncreas, intestino delgado y riñón	Vesículas de secreción, lisosomas, membrana plasmática, endosomas, mitocondrias y vesículas sinápticas
SLC30A3	ZnT3	Cerebro, testículo y páncreas	Vesículas sinápticas
SLC30A4	ZnT4	Glándula mamaria, placenta, próstata, cerebro y riñón	Vesículas de secreción y membrana plasmática
SLC30A5	ZnT5	Corazón, placenta, páncreas, próstata, ovario, testículo, timo, hueso e intestino delgado	Golgi, vesículas y membrana plasmática
SLC30A6	ZnT6	Cerebro, pulmón e intestino	Golgi y vesículas
SLC30A7	ZnT7	Intestino, estómago, próstata, retina, páncreas, testículo y músculo	Golgi y vesículas
SLC30A8	ZnT8	Páncreas, tiroides, testículo y glándula adrenal	Gránulos secretores
SLC30A9	ZnT9	Generalizado	Núcleo y citoplasma
SLC30A10	ZnT10	Cerebro, hígado y retina	Desconocido

Tabla 9. Resumen de los miembros de la familia de transportadores ZnT (SLC30).

Se muestran los diferentes miembros de la familia de transportadores de zinc iónico ZnT, indicando su localización tanto a nivel de tejido como a nivel subcelular (Modificado de Huang y Tepasamorndech, 2013).

2) ZIP (familia SLC39).

Los transportadores ZIP son proteínas transmembrana cuya función principal es la de aumentar el contenido de zinc iónico del citoplasma ya sea capturándolo del exterior celular y bien extrayéndolo del interior de diversos compartimentos membranosos intracelulares. Reciben el nombre del primer miembro identificado ZIP (*ZRT*, *IRT-like Protein*), transportador regulado por zinc (tabla 10). Se caracteriza por tener una estructura formada por 8 segmentos transmembrana donde los extremos amino- y carboxilo-terminal se localizan en el exterior de la célula (Guerinot, 2000). Estos transportadores capturan zinc con una elevada eficiencia. Se han identificado 14 secuencias correspondientes a estas familias en el genoma humano (SLC39A1-SLC39A14) (Eide, 2003). De entre ellas se han caracterizado en tejidos los siguientes:

- El **ZIP1** se expresa en gran parte de los tejidos humanos, tanto en adultos como durante el desarrollo (Gaither y Eide, 2001; Lioumi *et al.*, 1999).

- El **ZIP2** posee una expresión ubicua, aunque baja tanto en útero como en la próstata (Gaither y Eide, 2000).

- El **ZIP3** posee una expresión ubicua aunque más elevada en testículos (Dufner-Beattie *et al.*, 2003).

- El **ZIP4** participa en la captura de zinc de la dieta, expresándose en el estómago y el intestino, y se encuentra mutado en pacientes con acrodermatitis enteropática (Kury *et al.*, 2002).

- El **ZIP5** está implicado junto con el ZIP4 en la acrodermatitis enteropática, con una expresión deficiente en los enterocitos (Wang *et al.*, 2004).

- El **ZIP6** es un transportador localizado en la membrana plasmática de células de la placenta, próstata y glándulas mamarias, y es sensible a hormonas esteroideas (Taylor y Nicholson, 2003). Está implicado en la progresión del cáncer metastático de pulmón y mama, y también está relacionado con la respuesta inmune (Kitamura *et al.*, 2006).

- El **ZIP7** se expresa de forma ubicua en los tejidos, localizándose en la membrana del aparato de Golgi y estando ausente en la membrana plasmática (Huang *et al.*, 2005). Se cree que su expresión aumentaría los niveles intracelulares de zinc que activarían el EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) aumentando el crecimiento e invasión del cáncer de mama (Taylor *et al.*, 2008).

- El **ZIP8** se localiza en la membrana plasmática, y se expresa en cerebro, pulmón, testículo, hígado y riñón. Actúa como un transportador de cationes divalentes para el manganeso y cadmio, aunque con mayor afinidad por el zinc (Dalton, 2005).

- El **ZIP9** se localiza en la red trans del aparato de Golgi, se desconoce su función ya que no interviene significativamente en la homeostasis citosólica del zinc (Matsuura *et al.*, 2009).

- El **ZIP10** se localiza en la membrana plasmática y su gen posee un elemento de unión al factor de transcripción regulado por metales 1 (MTF-1) que reprime la expresión del transportador. Tiene una función importante en el progreso del cáncer de mama metastático (Kagara *et al.*, 2007).

- El **ZIP11** se localiza en los testículos y el sistema digestivo. Se expresa con bajas concentraciones de zinc en la dieta (Martin *et al.*, 2013).

- El **ZIP12** no tiene estructura y función bien definidas, pero su mutación se relaciona con problemas en el desarrollo del SNC (Chowanadisai *et al.*, 2013).

- El **ZIP13** se localiza en la membrana del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático, y su carencia afecta a las hidrolasas del retículo que se unen al hierro en vez de al zinc (Giunta *et al.*, 2005).

- El **ZIP14** se localiza en la membrana plasmática, es muy abundante en los hepatocitos y en los astrocitos (Bishop *et al.*, 2010). Está implicado en la captación tanto de zinc como de hierro en el hígado, y en la respuesta inflamatoria dependiente de IL-6 (Siewert *et al.*, 2004).

Transportadores ZIP			
Gen	Proteína	Distribución Tejido	Localización subcelular
SLC39A1	ZIP1	Generalizado	Membrana plasmática y vesículas intracelulares
SLC39A2	ZIP2	Generalizado	Membrana plasmática
SLC39A3	ZIP3	Glándula mamaria y testículo	Membrana plasmática y lisosomas
SLC39A4	ZIP4	Intestino, riñón, cerebro	Membrana plasmática y lisosomas
SLC39A5	ZIP5	Páncreas, riñón, hígado, estómago e intestino	Membrana plasmática
SLC39A6	ZIP6	Generalizado	Membrana plasmática
SLC39A7	ZIP7	Generalizado	Golgi, retículo y vesículas intracelulares
SLC39A8	ZIP8	Generalizado	Membrana plasmática, lisosomas y mitocondrias
SLC39A9	ZIP9	∅	Golgi
SLC39A10	ZIP10	Cerebro, hígado, riñón	Membrana plasmática
SLC39A11	ZIP11	∅	∅
SLC39A12	ZIP12	Cerebro, pulmón, testículo y retina	∅
SLC39A13	ZIP13	Generalizado	Golgi y vesículas intracelulares
SLC39A13	ZIP13	Hígado	Membrana plasmática

Tabla 10. Resumen de los miembros de la familia de transportadores ZIP (SLC39).

Se muestran los diferentes miembros de la familia de transportadores de zinc iónico ZIP, indicando su localización tanto a nivel de tejido como a nivel subcelular (Modificado de Jeong y Eide, 2013).

3) DCT.

Los transportadores generales para cationes divalentes (*DCT*, *Divalent Cation Transporter*), también conocido como *DMT* (*Divalent Metal Transporter*, Andrews, 1999) se expresan en un gran número de tejidos. Poseen 12 segmentos transmembrana y funcionan en simporte (acoplado a un protón cotransportado en la misma dirección) en un mecanismo dependiente del potencial de membrana. Los DCT son capaces de transportar una gran variedad

de cationes metálicas divalentes (Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y Pb^{2+}) tanto esenciales como tóxicos (Gunshin *et al.*, 1997; Forbes *et al.*, 2003; Knopfel *et al.*, 2005).

4) ATPasas de tipo P.

Las **ATPasas de tipo P** son una familia de transportadores de metales, que dependen de la energía obtenida por la hidrólisis del ATP (Solioz *et al.*, 1994). Las ATPasas de tipo P (llamadas así porque el fosfato liberado en la hidrólisis del ATP se une de forma covalente a la enzima intermediaria) están ampliamente distribuidas tanto en eucariotas como en procariontes y sus sustratos son iones como H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} o Cd^{2+} . Se localizan en la membrana plasmática y pueden transportar iones hacia el interior celular, o bien funcionar como sistemas de expulsión, desplazando metales tóxicos hacia el espacio periplásmico. Estas ATPasas están formadas por seis dominios transmembrana, con una región citoplasmática que une el ATP, y varias cisteínas que atrapan los metales que tienen que ser expulsados.

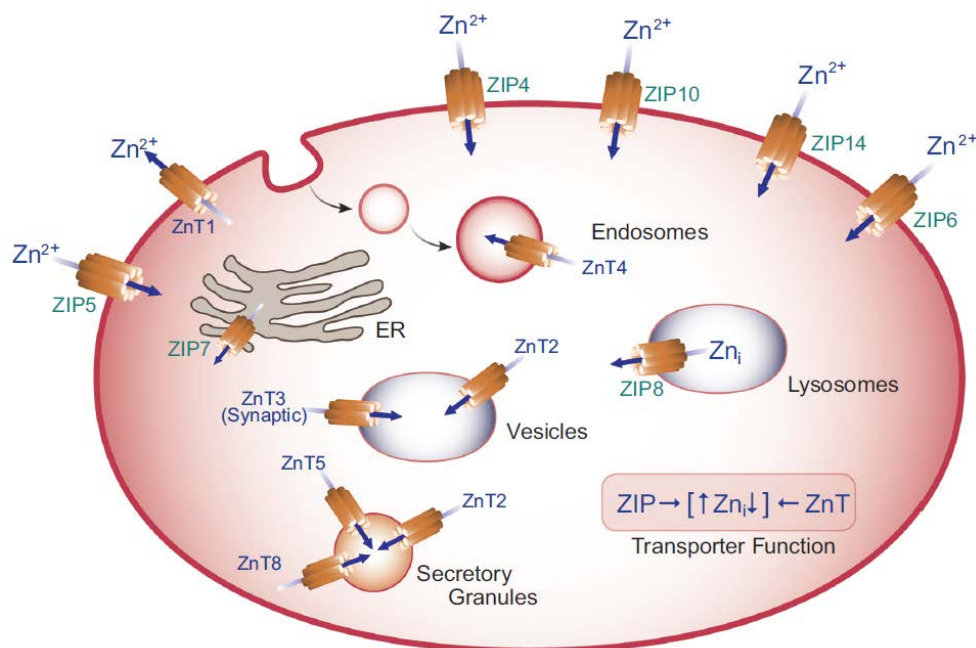


Figura 14. Resumen de los transportadores de zinc.

Se muestra la localización de los principales miembros de las dos familias de transportadores específicos de zinc (ZnT y ZIP) en los distintos orgánulos membranosos, indicando en cada caso la dirección de los iones zinc (Lichten y Cousins, 2009).

2.4.2 Metalotioneínas.

Un elemento importante para mantener la homeostasis del zinc es la presencia de metalotioneínas (MT), que son proteínas de bajo peso molecular y con un alto contenido en grupos sulfhidrilo de aminoácidos cisteína (Ebadi *et al.*, 1995). Estas proteínas se encuentran en todos los tejidos de los mamíferos. A nivel celular las MT se localizan principalmente en el citoplasma, aunque también se han encontrado en el interior de lisosomas y en el núcleo celular. El grupo sulfhidrilo de la cisteína puede unir átomos de metales esenciales (zinc y cobre), y de no esenciales (cadmio, plomo, oro y mercurio). Las MT poseen dos dominios a los cuales se unen los metales divalentes, el dominio α (C-terminal) que contiene 11 cisteínas capaces de unir 4 átomos metálicos y el dominio β (N-terminal) contiene 9 cisteínas y puede fijar 3 átomos (figura 15). Existen varias isoformas de estas proteínas. Las metalotioneínas 1 y 2, se expresan de forma ubicua. La metalotioneína 3 se aisló inicialmente en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Uchida *et al.*, 1991), y se localiza específicamente en el cerebro, esta metalotioneína parece ser la más importante en la homeostasis del zinc en las neuronas que poseen zinc vesicular (Masters *et al.*, 1994). Y la metalotioneína 4 se encuentra en tejidos córneos estratificados y escamosos de la piel.

La expresión de MT se incrementa con la exposición a elevadas concentraciones de zinc (Ebadi, 1986; Hidalgo *et al.*, 1994). Esto se debe a que los genes que codifican para las metalotioneínas poseen en sus promotores varios elementos de respuesta a este metal, los denominados elementos regulados por metal (MREs), a estos elementos se les une el factor de transcripción sensible a metales del tipo 1 (MTF-1) que es una proteína regulada por metales (MRP) (Radtke *et al.*, 1993). Además de la inducción de la síntesis de MT por diferentes metales, existen también otros factores fisiológicos que han mostrado ser inductores de la síntesis de las MT, como los glucocorticoides, el glucagón, las IL-1 y 6, la diabetes, el etanol, etc.

Las funciones de las MT dependen en gran medida del metal al que se unan. En el caso del zinc (que es un metal menos reactivo y tóxico que el cobre y el cadmio), su función sería la de contener iones zinc unido lábilmemente, dadas las bajas constantes de afinidad entre las MT y el zinc, para ser utilizado cuando sea necesario, ya sea en la activación de enzimas en procesos de anabolismo y catabolismo, o en la transferencia de información genética. Además, tienen un papel importante en la captura e inactivación de radicales libres, y en la modulación de la expresión genética transfiriendo o eliminando iones zinc de los varios factores de transcripción provocando la activación o inactivación de procesos génicos.

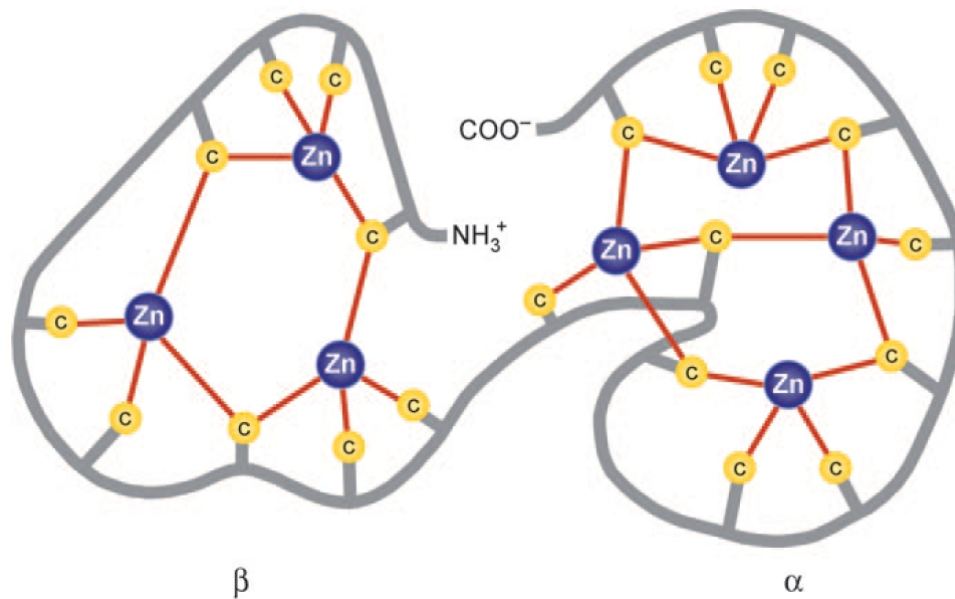


Figura 15. Estructura molecular de las metalotioneínas.

Se muestra la estructura molecular de la MT y el patrón de unión a los iones zinc organizados en los dos dominios de unión a zinc, el dominio α con 4 átomos y el dominio β con 3 átomos mediante los enlaces a la cisteína (Bell y Vallee, 2009).

2.4.3 Canales iónicos.

La entrada de zinc en neuronas en reposo se produce probablemente a través de transportadores, mientras que en condiciones depolarizantes puede ocurrir a través de canales iónicos. En neuronas en reposo, se observa una K_M de 10-20 μM , lo que revela una elevada eficiencia para la captura de zinc iónico (Howell *et al.*, 1984; Colvin, 1998). La entrada de zinc en condiciones de reposo varía según el nivel de pH, así si se acidifica el medio, se inhibe la captura de zinc (Colvin *et al.*, 1998).

La entrada de zinc se produce también a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Kim *et al.*, 2000), canales de glutamato sensibles a AMPA/KA (Sensi *et al.*, 1999), canales glutamato sensibles a NMDA (Christine y Choi, 1990), y a través del intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (Yu y Choi, 1997). Todos estos canales son, en principio, específicos para iones calcio, pero los iones zinc hidratados tienen tamaños similares a los iones calcio hidratados, por lo que pueden entrar a través de estos canales (Yu y Choi, 1997).

Se ha encontrado un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$ que se encarga de expulsar zinc del citoplasma introduciendo sodio en las células (Ohana *et al.*, 2003) siendo una vía más de salida del zinc en las células.

La entrada de zinc es sensible a la depolarización. La depolarización inducida con alta concentración de potasio o con ácido kaínico aumenta la entrada de zinc en cultivos de neuronas corticales (Sheline *et al.*, 2002), por el contrario, las células gliales son insensibles a esta depolarización (Sheline *et al.*, 2004).

2.4.4 Astrocitos.

Los astrocitos son células metabólicamente muy activas, cuya capacidad de movilización de zinc es muy grande y rápida. La función de homeostasis del zinc es llevada a cabo por los astrocitos, principalmente debido a su menor sensibilidad al daño tóxico producido por el zinc en comparación con las neuronas (Dineley *et al.*, 2000; Sheline *et al.*, 2004), su capacidad para capturar el zinc extracelular (Varea *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009) y su capacidad para eliminar el zinc extracelular por la liberación de metalotioneínas.

Los astrocitos son capaces de capturar y acumular zinc iónico rápidamente (Nolte *et al.*, 2004) y también expresan gran cantidad de transportadores, incluyendo el ZIP14 (Bishop *et al.*, 2010) y el ZnT3 (que está íntimamente implicado en la cognición) bajo condiciones de estrés (Sun *et al.*, 2012). Se sabe que las células gliales en el cerebelo también expresan los transportadores ZnT1, ZnT3, ZnT4 y ZnT6 (Wang *et al.*, 2005).

La estrecha asociación y coliberación de zinc y glutamato durante la sinapsis demuestra, por lo tanto, el papel fundamental de los astrocitos en la regulación sináptica de zinc, que puede ser crítica para la prevención de la excitotoxicidad u otros procesos postsinápticos o cognitivos.

Además, los astrocitos incrementan los niveles de Ca^{2+} intracelulares en respuesta a la transmisión sináptica (Morris *et al.*, 2013). Esto puede ser importante en la LTP que es inducida por la estimulación de alta frecuencia provocando un aumento prolongado de la transmisión que, por lo general, depende de la entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de NMDA. Estudios recientes en los que se injertan astrocitos humanos en ratones, mostraron una mayor LTP y un mejor desempeño en las pruebas cognitivas (Han *et al.*, 2013).

Se sabe que las interacciones entre neuronas, astrocitos, zinc y glutamato es crítico para la función y la salud sináptica normal, afectando potencialmente a la neurotransmisión y otras cascadas celulares implicadas en la cognición.

El deterioro de las habilidades de aprendizaje y memoria durante el envejecimiento y algunas patologías, puede ser causado por un fallo en la comunicación neurona-glía y en la transmisión de la sinapsis consecuencia de una homeostasis alterada del zinc, provocando graves perjuicios al funcionamiento de la transmisión sináptica.

Los zincosomas generados por los astrocitos son indicadores de una correcta captura y manipulación del zinc exógeno (Sekler *et al.*, 2007). Además, los zincosomas están en contacto con el citoesqueleto (micro y gliofilamentos), lo que les permite a los astrocitos movilizar el zinc con gran rapidez para restaurar los valores basales de zinc.

2.5 Déficit de zinc y enfermedades.

El zinc es un oligoelemento esencial, que es fundamental para un gran número de proteínas estructurales, procesos enzimáticos y factores de transcripción. La función del zinc es de gran importancia durante el crecimiento y desarrollo, incluyendo el desarrollo del cerebro de los mamíferos, fue reconocido durante el primer tercio del siglo XX (Todd *et al.*, 1934) y fue observada en humanos en 1963 (Prasad, 1991). Desde entonces, las funciones del zinc y los efectos de su deficiencia en el cerebro y otros órganos, han sido continuamente estudiados (Bitanhirwe y Cunningham, 2009). Se pueden causar efectos leves o mortales dependiendo de los niveles de zinc y del tiempo de acción. Hay muchas manifestaciones clínicas que incluyen los sistemas epidérmico, gastrointestinal, nervioso central, inmunológico, esquelético y reproductor. Estos efectos aparecen en un amplio espectro dependiendo de la magnitud de la deficiencia y, lo que es más importante, las diferentes manifestaciones clínicas vistas en la deficiencia de zinc, muestran la variedad de funciones que el zinc desempeña en las numerosas partes del cuerpo (Tuerk y Fazel, 2009).

Como zinc es esencial para la función normal del cerebro, la desregulación del zinc se ha relacionado con una variedad de anormalidades neurológicas incluyendo la depresión y la esquizofrenia (Levenson y Tassabehji, 2007), enfermedad de alzheimer (EA), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), síndrome de Down (SD), esclerosis múltiple (EM) (Grabrucker *et al.*, 2011) y el déficit cognitivo relacionado con la edad (Adlard *et al.*, 2014). Trastornos neurológicos, como la isquemia, las convulsiones y la lesión cerebral traumática también han sido relacionadas con los niveles alterados de zinc (Nolte *et al.*, 2004; Grabrucker *et al.*, 2011). Además de esto, el exceso de zinc se ha relacionado con los procesos que conducen al daño celular a través de la excitotoxicidad o el estrés oxidativo (Morris y Levenson, 2012). Esto es particularmente pertinente en la sinapsis, donde la presencia o ausencia de zinc es crucial (Hancock *et al.*, 2014).

2.5.1 Zinc y SAF.

El consumo de alcohol durante la gestación puede causar un déficit de zinc, como se demostró en las mujeres embarazadas, que se analizaron en estudios del SAF (Flynn *et al.*, 1981). Estos graves efectos también se encontraron en roedores expuestos al alcohol o a una

dieta baja en zinc durante el embarazo (Carey *et al.*, 2000; Record *et al.*, 1986) y, bajo ciertas condiciones experimentales, el tratamiento con zinc se ha demostrado que revierte los graves efectos causados por el alcohol en los fetos de ratones (Summers *et al.*, 2009). En otras condiciones, sin embargo, los efectos del alcohol sobre la pérdida neuronal no disminuyó con la suplementación con zinc (Chen *et al.*, 2001). Por lo tanto, la suplementación con zinc no siempre es recomendable, ya que puede aumentar la mortalidad o conducir a un mayor deterioro; incluso una ingesta elevada, podría resultar en una deficiencia en otros metales o en el retraso del crecimiento (Tuerk y Fazel, 2009).

2.5.2 Zinc y síndrome de Down.

El metabolismo del zinc está alterado en el SD y se ha observado una reducción de los niveles de zinc en el plasma de niños (Lima *et al.*, 2010) y adolescentes con SD (Marques *et al.*, 2007). El zinc es un micronutriente necesario para diversos procesos celulares relacionados con el crecimiento y la diferenciación, la transcripción y la apoptosis. Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis intracelular de zinc es crucial para la supervivencia y el funcionamiento celular.

Se ha sugerido que la deficiencia de zinc en pacientes con SD pudiera estar relacionada con la activación de sistemas enzimáticos dependientes de este elemento, los cuales están involucrados en la respuesta inmunitaria o con el transporte de este elemento. Esto es debido a que una parte del zinc es transportado por una α_2 macroglobulina y se ha descrito que los niños con SD tienen niveles alterados de α_1 y α_2 globulinas (Parisi y Vallee, 1969).

Se ha estudiado en individuos con SD, que alteración en los niveles de zinc así como trastornos del sistema inmunitario que abarcan la inmunidad celular, humoral y función fagocítica, y aunque no se ha dilucidado completamente el origen de dichas alteraciones, éstas se han asociado con la alta tasa de enfermedades infecciosas, presentes en este síndrome (Ugazio *et al.*, 1990). Además en individuos con SD, se ha asociado la reducción de las concentraciones séricas de zinc con niveles bajos de timulina (Licastro, 1993). Por lo tanto, es lógico suponer que exista una asociación entre la alteración de los niveles plasmáticos de zinc frecuentemente visto en pacientes con SD y los trastornos inmunitarios descritos en este síndrome.

Los individuos con SD presentan una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T cooperadores (CD4), de la relación entre éstos y los linfocitos T citotóxicos (CD4/CD8), así como también, una reducción en el porcentaje de células B (CD19) comparado con los controles (Soto-Quintana *et al.*, 2003).

Las enfermedades infecciosas representan la principal causa de muerte en estos individuos durante los primeros años de vida. Los índices de mortalidad en el SD subrayan la gran susceptibilidad a las infecciones y enfermedades autoinmunes, lo que sugiere que los individuos con SD tienen, con frecuencia, problemas de inmunodeficiencia (Rogers y Coleman, 1994).

2.5.3 Zinc y Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer fue originalmente descrita por Alois Alzheimer en 1907 siendo considerada la causa prevalente de demencia y pérdida de memoria en personas ancianas. Esta enfermedad se caracteriza por la acumulación y agregación de placas seniles, formadas por depósitos fibrilares del péptido amiloide en el cortex asociativo e hipocampo (Small y Cappai, 2006). Estos depósitos inducen inflamación progresiva de la zona, pérdida neuronal y aceleración en la deposición de nuevas placas. En estos depósitos se ha observado la presencia de zinc histoquímicamente detectable (Suh *et al.*, 2000). En pacientes con la enfermedad de Alzheimer se ha observado un incremento en la cantidad total de zinc presente en las áreas más sensibles a la enfermedad, como pueden ser el hipocampo, la amígdala y el cerebelo (Danscher *et al.*, 1997; Religa *et al.*, 2006) y por el contrario, una disminución de los niveles de zinc en el neocortex, tálamo e hipocampo (Panayi *et al.*, 2002).

El zinc estimula la agregación y deposición del péptido amiloide (Bush *et al.*, 1994). El tratamiento con quelantes de zinc, como el clioquinol, impiden el depósito del péptido amiloide (Cherny *et al.*, 2001) por lo que, variaciones en la distribución de zinc, la eficiencia en su eliminación del medio extracelular y su concentración en los terminales sinápticos pueden influir en la aparición y posterior progreso de la enfermedad (Szewczyk, 2013).

3. LOS ASTROCITOS Y EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Rudolph Virchow introdujo por primera vez el término neuroglia en 1850 (a menudo traducido como pegamento nervioso o cemento) a la comunidad científica. Virchow usó el término neuroglia para describir la sustancia o del tejido conectivo intersticial en el cerebro, reconociendo que difería en apariencia y consistencia de otros órganos.

En el cerebro existen mayoritariamente dos tipos de células neurales: las neuronas y la glía. La diferencia fundamental entre ellas es la excitabilidad. Las neuronas son eléctricamente excitables y pueden responder a estímulos externos generando un potencial de membrana que se propaga a través de una red neuronal mediante sinapsis químicas. Por contra, la glía no posee esa propiedad y además tiene capacidad mitótica, lo que no se da en las neuronas (Kandel *et al.*, 2007).

Las células gliales constituyen el 90% de las células neurales (figura 16), son uno de los tipos celulares más abundantes del Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados, y juegan un papel muy importante durante el desarrollo, mantenimiento y regeneración del sistema nervioso adulto.

Las células gliales desempeñan papeles críticos en los procesos metabólicos vinculados con la actividad neuronal, tales como el flujo de sangre, la energía y la utilización de la glucosa (Magistretti, 2006). Durante la embriogénesis, la glía radial (GR) proporciona orientación física y química para la migración de las neuronas jóvenes, y sirve como precursor de células neurales multipotenciales, que tienen la capacidad de auto-renovación y de generar neuronas (Sanai *et al.*, 2004) y oligodendrocitos (Ventura y Goldman, 2007). Durante la sinaptogénesis, las células gliales y los factores neurotróficos derivados de la glía promueven la formación de sinapsis funcionales maduras (Ullian *et al.*, 2001), regulan los niveles de neurotransmisores en el espacio extracelular y el metabolismo energético en el cerebro (Magistretti, 2006), y juegan un papel clave en la función sináptica (Haydon, 2001; Fields y Stevens-Graham, 2002).

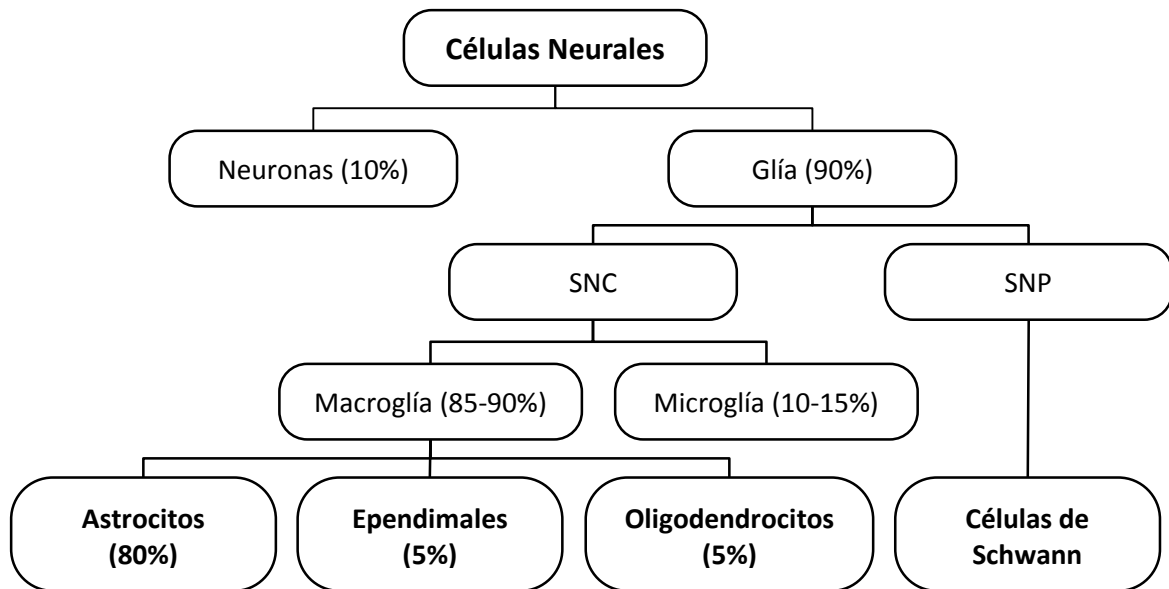


Figura 16. Tipos de células neurales.

Las células neurales se pueden clasificar en neuronas y células gliales, siendo estas últimas mucho más numerosas. Existen diferentes tipos de células gliales pertenecientes tanto al SNC como al SNP. Los astrocitos son el tipo celular glial más abundante del SNC (Modificado de Verkhratsky y Butt, 2007).

Las células gliales en el SNC se dividen en dos grupos, macroglía y microglía. Dentro de la macroglía encontramos tres tipos celulares: los astrocitos, los oligodendrocitos y las células ependimales, conocidas en conjunto como células neurogliales. Los **oligodendrocitos** se encargan de producir la mielina, la cual aísla los axones y permite la rápida propagación de los potenciales de acción (Bradl y Lassmann, 2010). Las **células ependimales** forman las paredes de los ventrículos del cerebro y el canal central de la médula espinal, y además participan en la producción y circulación del líquido cefalorraquídeo (CSF) (de Reuck y Vanderdonckt, 1986). Más allá de la macroglía, la glía comprende también la microglía, son células gliales de origen no neuronal (mesodérmicas) y derivan de macrófagos que invaden el cerebro durante etapas iniciales del desarrollo (Graeber y Streit, 2010). Por otro lado, en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), el principal tipo de célula glial son las **células de Schwann**, que envuelven y mielinizan los axones periféricos (Mirsky y Jessen, 1996).

Los **astrocitos**, actúan como soporte estructural y nutritivo de las neuronas, son intermediarios metabólicos entre las células endoteliales de los capilares y las neuronas, y están implicados en muchas funciones incluyendo la estimulación del cono de crecimiento axónico, la maduración y migración de neuronas, sinaptogénesis y plasticidad sináptica, regulación del tránsito de iones y neurotransmisores del microentorno, producción de factores de crecimiento y regulación del contenido de agua, energía y nutrientes de las neuronas (Vernadakis, 1996; Tsacopoulos y Magistretti, 1996; Magistretti y Pellerin, 1999).

La morfología de los astrocitos es muy variada y heterogénea generando una variedad de perfiles morfológicos, aunque la mayoría tienen una morfología estrellada con varias prolongaciones generadas a partir del soma. La característica morfológica más común de los astrocitos es la expresión de los filamentos intermedios que forman el citoesqueleto, cuyo principal componente son la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y la vimentina. La expresión de GFAP se utiliza comúnmente como marcador específico para identificar astrocitos (Eng *et al.*, 2000). Funciona bien en astrocitos en cultivo, pero *in vivo* los valores de GFAP varían mucho y no todos los astrocitos la expresan (Kimelberg, 2004). Por ejemplo, la GFAP se expresa prácticamente en todas las células de la glía de Bergman en el cerebelo, sin embargo, solo se expresa entre un 15-20% en los astrocitos del córtex de animales adultos.

Algunos autores sugieren que los astrocitos son activos “compañeros” de las neuronas en el procesamiento de la información y la integridad sináptica, y hay evidencias de que los astrocitos responden a la actividad neuronal, elevando los niveles intracelulares de calcio y liberando neurotransmisores que pueden afectar la actividad neuronal (Bezzi y Volterra, 2001; Haydon, 2001; Pascual *et al.*, 2001).

Se conoce que en estas interacciones astrocito-neurona (tabla 11), están implicadas una serie de factores tales como moléculas de adhesión y reconocimiento, factores de crecimiento y otras neurotrofinas, que son expresadas tanto por las células neuronales como gliales. Estas moléculas, son principalmente glicoproteínas que se sintetizan y se secretan al medio o se presentan en la superficie celular donde ejercen sus efectos fisiológicos.

Propósito de la asociación	Eventos fisiológicos	
	Neurona	Astrocito
Homeostasis		
Secuestro o redistribución de K ⁺	Liberación de K ⁺	Captación y redistribución de K ⁺
Captación de neurotransmisor	Liberación de glutamato	Captación de glutamato
Control respiratorio	Modulación de la respiración de las neuronas	Detección del pH sanguíneo y modulación de la descarga de las neuronas
Metabólico		
Ciclo glutamato-glutamina	Captación de glutamina para la síntesis de glutamato	Síntesis y liberación de glutamina
Fijación de amonio	Liberación de amonio	Fijación de amonio
Glucógeno astrocitos y metabolismo energético en neuronas	El lactato para el metabolismo energético/aprendizaje	Degradación del glucógeno a lactato
Desintoxicación de los radicales libres del cerebro	Liberación de radicales libres	Captación de radicales libres
Señalización		
Interacción entre las neuronas y astrocitos mediada por transmisor	Detección de la liberación de transmisor	Liberación de transmisor
	Modulación de los EPSP y los IPSP (potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios)	
Control del flujo de sangre	Actividad neural	Liberación de productos de la ciclooxigenasa mediada por receptores de glutamato
Control de la concentración de Adenosina	Liberación de Adenosina (o ATP)	Ajuste de la concentración de Adenosina para controlar la excitabilidad (vía adenosina quinasa)
Tróficos		
Secreción de factores tróficos (bFGF, GDNF, etc.)	Efectos tróficos	Liberación de factores
Regulación de la sinaptogénesis	Formación de sinapsis	Liberación de factores
Guía axonal	Crecimiento dirigido	Expresión de moléculas atractivas o aversivas

Tabla 11. Clasificación de las asociaciones astrocito-neurona.

Se muestran los diferentes tipos de asociaciones establecidas entre las neuronas y los astrocitos, y el reparto de funciones, muchas veces complementarias entre ambos, para el correcto funcionamiento de la transmisión sináptica y otros procesos fisiológicos (Modificado de Richard Milner, 2012).

3.1 Ontogenia de las células astrogiales.

Durante mucho tiempo se había especulado que los neuroblastos y glioblastos aparecían muy al principio en el desarrollo, y que eran dos poblaciones celulares distintas, las productoras de neuronas o células gliales, respectivamente (figura 17A, teoría clásica). Además, se hipotetizaba que estas células precursoras solamente aparecían durante el desarrollo y desaparecían en el cerebro adulto. Actualmente, se sabe que todas las células neurales derivan, desde los primeros estadios del desarrollo, de la pared del tubo neural, del neuroepitelio. Estas células son proliferantes y pluripotentes, y dan lugar a las primeras generaciones de los precursores neurales, ya que su progenie puede diferenciarse a precursores neuronales o gliales (neuroblastos o glioblastos) que posteriormente, pueden acabar dando neuronas o células macrogliales (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009) (figura 17B, teoría actual).

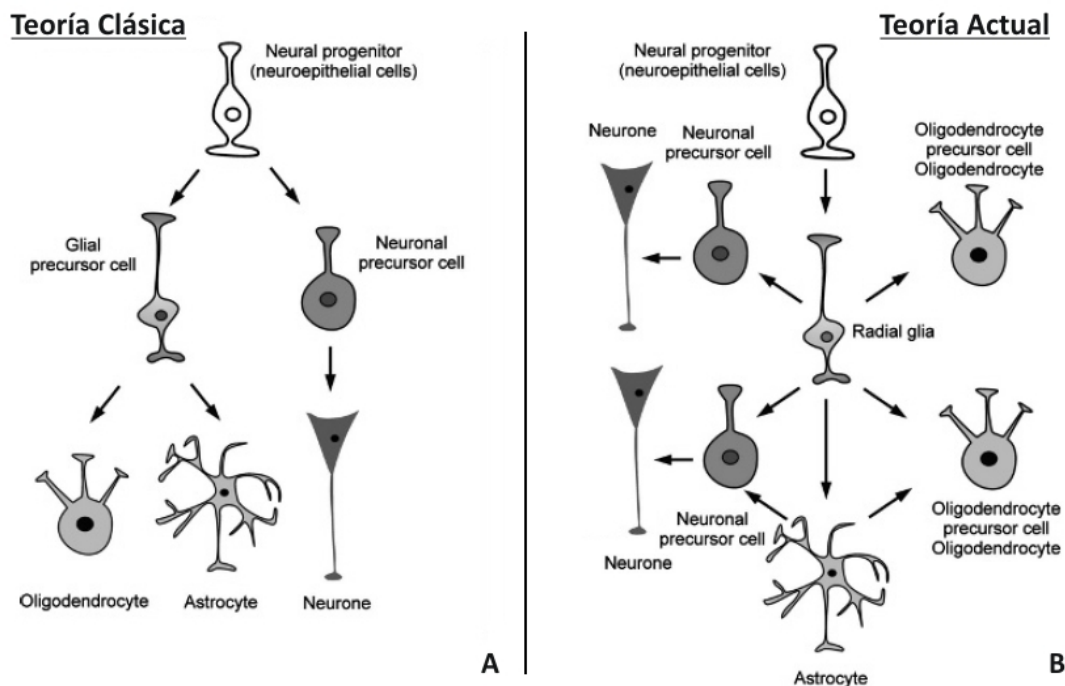


Figura 17. Ontogenia de las células neurales.

Tradicionalmente se creía que, solo existían precursores neuronales y gliales en etapas iniciales del desarrollo, y que eran capaces de diferenciarse dando lugar a neuronas y células gliales, respectivamente (A). Actualmente se sabe que un único precursor neural, es capaz de dar tanto neuronas como células gliales, que está presente en el cerebro adulto y que posee características de la glía (B) (Figura modificada de Verkhatsky y Butt, 2007).

Durante las etapas iniciales del desarrollo, algunos de glioblastos o células neuroepiteliales mantienen uniones con ambas superficies del tubo neural durante el desarrollo cortical, formándose la glía radial, que forma una población de células con amplia potencialidad gliogénica y neurogénica, y juegan un papel importante en la organización espacial de las diferentes capas de la corteza cerebral y cerebelar.

gliogénica y neurogénica, y juegan un papel importante en la organización espacial de las diferentes capas de la corteza cerebral y cerebelar.

Los glioblastos y células derivadas de ellos mantienen contacto con la superficie externa del tubo neural, formando la membrana glial limitante superficial, que supone una barrera que aísla el interior del parénquima del tubo neural del espacio extracelular de las meninges. En esta membrana, están unidos los pies terminales por uniones estrechas que impiden la difusión de moléculas hidrosolubles por el espacio intercelular.

A continuación, cuando el crecimiento del parénquima nervioso alcanza mayor grosor, se produce la penetración de los vasos sanguíneos a la pared del tubo neural, la angiogénesis. Estos vasos arrastran la membrana glial limitante superficial, y muchas células gliales quedan con su pie terminal invaginado y arrastrado hacia el interior del parénquima nervioso, y formarán las futuras células de astrogía, mientras que las que mantienen el pie terminal en contacto con las meninges forman las futuras células de la glía terminal.

Finalmente, en la cara interna del tubo neural quedan algunas células residuales del primitivo neuroepitelio llamadas endimocitos, las cuales contactan entre sí por medio de uniones estrechas, que también suponen una barrera hermética que separa el parénquima nervioso de la cavidad ventricular interna del tubo neural. La mayoría de los endimocitos han perdido la conexión con la superficie externa del tubo neural, aunque en algunos centros como el hipotálamo, los endimocitos conservan esta conexión y recuerdan las primitivas células de glía radial, son los llamados tanicitos.

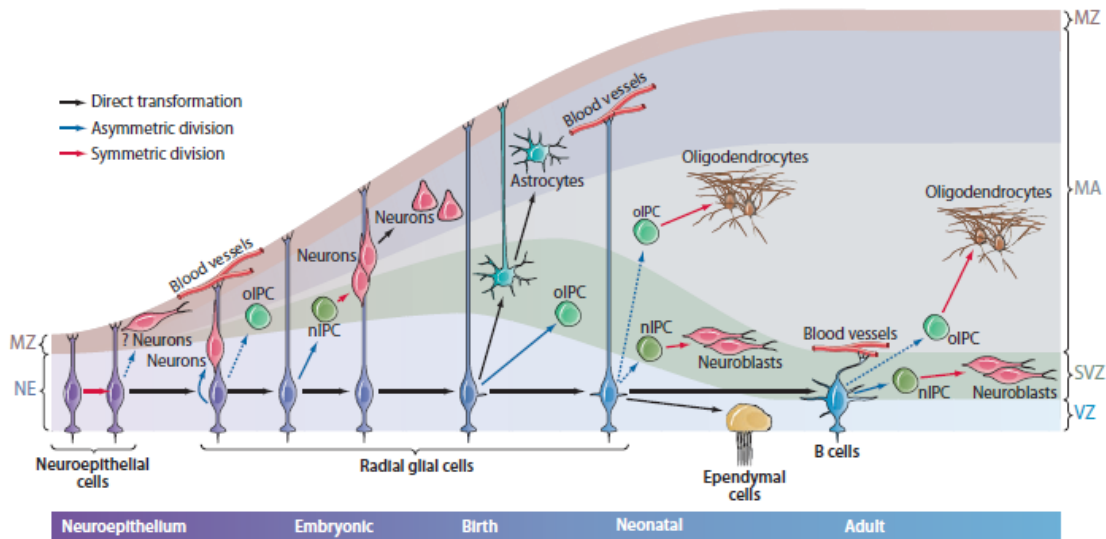


Figura 18. Neurogénesis durante el desarrollo.

Se muestran el proceso de generación de los distintos tipos de células nerviosas, desde las etapas iniciales en el neuroepitelio, hasta etapas postnatales y la edad adulta, con toda la variedad celular establecida. MZ, zona marginal; MA, manto; SVZ, zona subventricular; VZ, zona ventricular; NE, neuroepitelio; nIPC, célula progenitora intermediaria neurogénica; olIPC, célula progenitora intermediaria oligodendrítica; RG, glía radial (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009).

El desarrollo de astrocitos y oligodendrocitos a partir de precursores gliales pasa por diferentes etapas. Primero se forma un precursor glial bipotencial, llamado O-2A (oligodendrocito tipo 2 astrocito) que puede llegar a diferenciarse a cualquier tipo de célula glial (Raff *et al.*, 1983). Los precursores gliales son pequeños, con pocas prolongaciones y móviles, pudiendo migrar por toda la sustancia blanca y la gris cerebrales. A medida que migran, estos precursores se diferencian y adquieren marcadores astrocitarios u oligodendríticos. En el lóbulo frontal, los precursores neurales de la zona subventricular migran hacia la sustancia blanca de la corteza, y se convierten en astrocitos, oligodendrocitos y glía NG2 (Levison y Goldman, 1993; Luskin, 1993; Luskin y MsDermott, 1994). En el cerebelo, la glía de Bergmann y algunos astrocitos derivan de la glía radial, y más adelante en el desarrollo migrarán desde un área dorsal hacia el cuarto ventrículo dando lugar a astrocitos y oligodendrocitos (Zhang y Goldmann, 1996; Milosevic y Goldmann, 2002). En la retina embrionaria, un mismo precursor dará lugar a neuronas y células de Müller, mientras que precursores gliales que migran hacia el nervio óptico se diferencian a astrocitos (Skoff y Knapp, 1991). Por último, en la espina dorsal, astrocitos y oligodendrocitos derivan de diferentes precursores de la zona ventricular (Pringle *et al.*, 2003).

Además, el cerebro postnatal y adulto en los mamíferos tiene características neurogénicas y/o gliogénicas. Contiene precursores neuronales con características gliales, los cuales pueden proporcionar nuevas neuronas en los adultos bajo ciertas condiciones, que se añaden a los circuitos neurales (Doetsch, 2003). No obstante, esta presentación de nuevas

neuronas está restringida a zonas que mantienen características embrionarias y están pobladas por células proliferantes, como el hipocampo (zona subgranular) y el bulbo olfativo (zona subventricular) (Jin, 2001, Doetsch *et al.*, 1999). En estas regiones las células madre tienen propiedades astrocitarias y pueden diferenciarse tanto en neuronas como en glía (Goldman, 2003; Horner y Palmer, 2003).

3.2 Estructura de la astroglia.

Los astrocitos son las células gliales de mayor tamaño del SNC, con un soma en torno a 10 μm de diámetro, se caracteriza por tener una morfología estrellada con largas prolongaciones y muy ramificadas, que pueden llegar hasta las 100 μm de longitud (Fellin *et al.*, 2006), estos astrocitos se llaman protoplasmáticos. La mayoría de las sinapsis del hipocampo (57%) están reguladas por astrocitos, que están en contacto tanto con el terminal presináptico como postsináptico. Se ha estimado que un astrocito puede ponerse en contacto con entre 300-600 dendritas (Halassa *et al.* 2007) y puede regular más de 100.000 contactos sinápticos en roedores, lo que nos da una idea de su gran importancia en la regulación sináptica y en la complejidad de su morfología (Bushong *et al.* 2002). En humanos, estos valores se incrementan aún más debido al mayor tamaño de los astrocitos protoplasmáticos, estimándose que un único astrocito puede intervenir hasta en dos millones de contactos sinápticos (Oberheim *et al.*, 2006).

En general, los astrocitos tienen un potencial de membrana negativo (-80 a -90mV aprox.), debido a que predomina la conductancia de K^+ , que mantienen el potencial de membrana cerca del potencial de equilibrio (E_{K}); sin embargo los astrocitos son heterogéneos respecto a los potenciales de membrana y las conductancias de potasio. La despolarización eléctrica de la glía da como resultado cambios en el potencial de membrana y no producen potenciales de acción. La distribución de iones a través de la membrana es similar a otros tipos celulares (concentración intracelular de K^+ es de $\sim 100\text{--}140\text{ mM}$; $\text{Na}^+ < 10\text{ mM}$, $\text{Ca}^{2+} < 0,1\ \mu\text{M}$). La principal excepción es el Cl^- , el cual es inusualmente alto en los astrocitos ($[\text{Cl}^-] \sim 30\text{--}40\text{ mM}$), debido a su alta actividad de los cotransportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, los cuales transportan 2Cl^- al interior de la células a cambio de 1K^+ y 1Na^+ .

Las células gliales expresan los principales tipos de canales iónicos dependientes de voltaje, incluyendo K^+ , Na^+ y Ca^{2+} . También son capaces de expresar la misma variedad de receptores que las neuronas, tanto ionotrópicos como de metabotrópicos, lo cual permite a la glía detectar activamente los neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica.

Expresan receptores de la mayoría de neurotransmisores, por lo que juegan un papel importante en la modulación de la excitación neuronal. Dado que los astrocitos pueden liberar una gran variedad de moléculas neuroactivas como glutamato, ATP, óxido nítrico,

prostaglandinas, ANP y D-serina, es considerado el tercer elemento activo en la sinapsis, junto con el elemento pre y postsináptico, formando lo que se conoce como la “sinapsis tripartita” (Volterra y Meldolesi, 2005).

Las células astrogliales en el cerebro están conectadas físicamente, formando un sincitio celular funcional. Esto representa una diferencia fundamental entre las redes neuronales y gliales. Para la gran mayoría de las neuronas, la creación de redes es proporcionada por los contactos sinápticos. Por contra, las redes gliales son soportadas por los contactos intercelulares directos, conocidos generalmente como uniones comunicantes de tipo GAP.

Las células gliales tienen todos los componentes de la maquinaria homeostática/señalización de Ca^{2+} . Una diferencia importante entre las células gliales y las neuronas, sin embargo, es la escasez relativa de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en las células gliales. La mayoría de los astrocitos no expresan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, sin embargo, las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje están presentes en las células astrogliales inmaduras, y su expresión está subregulada durante el desarrollo. Es probable que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje están implicados en el crecimiento y diferenciación de las células gliales.

La principal fuente glial de Ca^{2+} para la señalización, está asociada a los depósitos de Ca^{2+} del retículo endoplasmático rugoso (RER). La concentración de Ca^{2+} en el interior del RER en células gliales varía entre 100–300 μM , siendo por tanto inferior comparado con las neuronas, donde la concentración de Ca^{2+} en el RER alcanza valores entre 300–800 μM .

En condiciones fisiológicas, las células gliales son estimuladas por exposiciones relativamente breves y locales a los neurotransmisores. Sin embargo, estos eventos altamente localizados (que en esencia son una suma de varias ráfagas) pueden dar lugar a una señal de propagación que inunda toda la célula. Es importante destacar que en las células gliales, especialmente en los astrocitos, la propagación de estas ondas de Ca^{2+} no está limitada por las fronteras celulares, son capaces de cruzar los límites intercelulares y extenderse a una distancia relativamente larga a través del sincitio astrocítico.

Los neurotransmisores tales como el glutamato, ATP, GABA... son los sustratos materiales de la transmisión sináptica, y su liberación regulada en el SNC fue, durante muchos años considerada exclusiva de las neuronas y células neuroendocrinas. Las investigaciones experimentales de células gliales realizados durante los últimos 15 años, sin embargo, han demostrado claramente que algunos neurotransmisores pueden ser liberados por las células astrogliales (glutamato, aspartato, ATP, D-serina, taurina y homocisteína). Por lo tanto, la transmisión química es el mecanismo universal para la comunicación entre neuronas y astrocitos (todavía no se ha establecido que los oligodendrocitos, microglía o glía NG2 puedan

liberar neurotransmisores, aunque responden claramente a los neurotransmisores liberados por las neuronas y astrocitos). Los neurotransmisores pueden ser liberados por los astrocitos a través de varias vías, generalmente clasificados como no vesiculares y vesiculares, la diferencia está determinada por si el neurotransmisor está acumulado en vesículas especializadas antes de su liberación, o alternativamente, es liberado directamente desde el citosol. Todos los tipos de células gliales producen y liberan neuropéptidos (NPY, VIP, opioides, sustancia P, somatostatina, etc). La producción de neuropéptidos es específica de región, y en muchos casos regulada por el desarrollo.

Los factores neurotróficos son polipéptidos que regulan la supervivencia y la diferenciación de las células neuronales; una gran variedad de estos factores neurotróficos son producidos por células gliales. Particularmente importante son las neurotrofinas (el factor de crecimiento nervioso, NGF; neurotrofinas 3 y 4, NT-3, NT-4; y el factor neurotrófico derivado del cerebro, BDNF), que controlan una amplia variedad de funciones del SNC, desde el crecimiento y la diferenciación celular, a la transmisión sináptica, la regulación de la expresión de los canales iónicos y la reparación de los circuitos neuronales.

Las células gliales producen y liberan factores de crecimiento en condiciones fisiológicas y en caso de daño neuronal. En el primer caso, los factores de crecimiento derivados de células gliales regulan diversos aspectos de la diferenciación, crecimiento y desarrollo de las células neuronales; mientras que en el segundo caso, ayudan en los procesos responsables de la regeneración y reparación. En el desarrollo, los factores de crecimiento derivados de las células gliales regulan la migración de los precursores neuronales y a las neuronas inmaduras hacia su destino final, ayudan a la búsqueda de rutas neuronales, regulan el aspecto y la remodelación de los conjuntos sinápticos, y controlan la muerte de células nerviosas durante la ontogenia. Los astrocitos son los productores más prolíficos de los factores de crecimiento; los oligodendrocitos fabrican mucho menos, pero importantes como la netrina-1, que ejerce de guía axonal (ausente en astrocitos). El daño neuronal sobrerregula la producción y liberación de factores de crecimiento, especialmente a partir de astrocitos reactivos y células microgliales activadas.

El uso de distintas técnicas de trazado anatómico ha revelado que los astrocitos, cuando maduran, ocupan distintos dominios que no se superponen en el cerebro (Bushong *et al.*, 2002; Halassa *et al.*, 2007). Durante el desarrollo, aparecen procesos de astrocitos de forma bastante desigual y ocupan zonas donde se solapan con otros astrocitos adyacentes. Desde la tercera a la cuarta semana después del nacimiento, los astrocitos ocupan dominios espaciales distintos sin que se solapen procesos con otros astrocitos vecinos. Se cree que éstos, utilizan un mecanismo que mantiene su disposición respecto los unos de los otros. Esta disposición anatómica, da un paso más en la teoría que sugiere que hay dominios definidos de la función de los astrocitos

como islas sinápticas (Halassa *et al.*, 2007). Este concepto propone que todas las sinapsis confinadas dentro de los límites de un astrocito individual están moduladas por el mismo astrocito.

3.3 Tipos de astrogliá.

Aunque los tipos de astrocitos más conocidos y abundantes son los astrocitos fibrosos y protoplásmicos de la sustancia blanca y gris respectivamente, existen otros tipos de células astrogliales especializadas, localizadas en regiones del SNC. A continuación se detallan los tipos de astrogliá conocidos:

- 1.- **Astroцитos Protoplásmicos.** Están presentes en la sustancia gris. Poseen muchas proyecciones cortas (50 μm aprox.) las cuales son elaboradas y completas. Las prolongaciones de los astrocitos protoplásmicos hacen contacto con los vasos sanguíneos formando los “pies vasculares”, y forman múltiples contactos con las neuronas. Algunos astrocitos protoplásmicos también mandan prolongaciones a la superficie pial donde forman los “pies subpiales”. La densidad de estos astrocitos en la corteza varía entre 10.000 y 30.000 células por mm^3 . Sus proyecciones ocupan una superficie de hasta 80.000 μm^2 y pueden abarcar la práctica totalidad de las membranas neuronales dentro de su alcance (Bushong *et al.*, 2002).
- 2.- **Astroцитos Fibrosos.** Están presentes en la sustancia blanca. Sus proyecciones son largas (300 μm aprox.) pero mucho menos complejas en comparación con los astrocitos protoplásmicos. Las prolongaciones de los astrocitos fibrosos establecen contacto con los pies vasculares y los subpiales. También mandan numerosas proyecciones que contactan con los nódulos de Ranvier. La densidad de astrocitos fibrosos es de aproximadamente 200.000 células por mm^3 (Butt *et al.*, 1994).
- 3.- **Glía Radial.** Son células bipolares con un núcleo ovalado y prolongaciones alargadas. La glía radial normalmente posee dos prolongaciones principales, una formando el pie vascular en la pared del ventrículo y la otra en la superficie pial. La presencia de glía radial es una característica común del cerebro en desarrollo, porque son el primer tipo celular que se desarrolla a partir de los progenitores neurales. Desde los estadios embrionarios tempranos, la glía radial forma andamios que ayudan en el proceso de migración neuronal. Tras la maduración, la glía radial desaparece de muchas regiones del cerebro y se transforman en astrocitos satélite, aunque las células de la glía radial pueden perdurar como en la retina (glía de Müller) y en vertebrados inferiores como las tortugas.
- 4.- **Glía de Müller.** Es un tipo de glía radial especializada de la retina, la cual tiene muchos contactos con neuronas de la retina. La mayoría de este tipo de células tiene una morfología

característica y extienden sus prolongaciones longitudinales a lo largo de los conos y bastones. En regiones concretas de la retina adquieren un fenotipo similar al de los astrocitos protoplasmáticos. En humanos, las células de Müller ocupan hasta un 20% de todo el volumen de la retina y su densidad es de 25.000 células por mm^3 en la superficie de la retina. Una sola célula de Müller da soporte a 16 neuronas en la retina humana y hasta 30 neuronas en roedores (Sarchy y Ripps, 2001).

- 5.- Glía de Bergmann.** Son los astrocitos radiales del cerebelo de los vertebrados. Tienen un soma relativamente pequeño (15 μm de diámetro aprox.) y entre 3-6 prolongaciones que se extienden desde la capa de células de Purkinje hasta la piamadre. En estadios tempranos del desarrollo, estas células establecen contactos con la superficie ventricular y son verdaderas células gliales radiales, pero con el desarrollo de la capa granular, las células adquieren la morfología clásica de las células de la glía de Bergmann. En los roedores normalmente, cada neurona de Purkinje está rodeada por 8 células de la glía de Bergmann, y sus prolongaciones envuelven las dendritas de la célula de Purkinje. Las proyecciones de la glía de Bergmann son muy elaboradas y forman contactos estrechos con sinapsis formadas por fibras paralelas en dendritas de neuronas de Purkinje, cada células de glía de Bergmann proporciona cobertura hasta 6.000 sinapsis (Reichenbach *et al.*, 1995; Grosche *et al.*, 1999, 2002).
- 6.- Astrocitos Interlaminares.** Son específicos de la corteza cerebral de los grandes primates. Poseen largas proyecciones (1 mm aprox.) que se extienden desde el soma (localizado en la capa subgranular) hasta la capa IV cortical. Se desconoce su función, aunque podrían estar implicadas en delimitar los módulos corticales que se extienden a través de las capas corticales (Colombo *et al.*, 1995, 2001).
- 7.- Tanicitos.** Son astrocitos especializados que se encuentran entre el tercer ventrículo del cerebro y la eminencia media hipotalámica. En los órganos ventriculares, los tanicitos forman una barrera con capilares sanguíneos que contiene uniones fenestradas. Esto permite cierta permeabilidad entre el parénquima neural y el líquido cerebroespinal (Wolburg y Paulus, 2010).
- 8.- Pituicitos.** Son los astrocitos de la neurohipófisis. Sus proyecciones envuelven los axones secretores y terminaciones axonales en condiciones de reposo (Rosso y Mienville, 2009).

3.4 Funciones de la astrogía.

La lista de las funciones de los astrocitos en el SNC es cada vez mayor, hasta el punto de haber superado ya la lista de funciones realizadas por las neuronas. En prácticamente todos los estadios del desarrollo y patologías del cerebro están involucrados los astrocitos, de forma que afecta directamente a la función neuronal. Los astrocitos están implicados en el desarrollo y la función sináptica, por lo que hay evidencias que sugieren que la función sináptica alterada puede ser un factor importante para el desarrollo de muchas patologías.

Entre las muchas y variadas funciones de los astrocitos, se encuentran las de crear el ambiente cerebral, construir la microarquitectura del parénquima cerebral, mantener la homeostasis del cerebro, almacenar y distribuir sustratos energéticos, controlar el desarrollo de las células nerviosas, mantener la sinapsis y la sinaptogénesis, y proporcionar defensas al cerebro. A continuación se describen algunas de las funciones que desempeñan los astrocitos en el sistema nervioso:

1) Desarrollo.

La migración neuronal es un proceso vital para el desarrollo del sistema nervioso. Las primeras células neurales que se desarrollan son las de la glía radial, estas aparecen temprano en el desarrollo (días 11-13 en rata) y su función es la de proporcionar una estructura para guiar la migración de las neuronas desde la capa ventricular hasta sus destinos dando lugar al resto de células neurales.

Posteriormente, la glía radial fetal desaparece y se transforma en astrogía (Mori *et al.*, 2005). En etapas embrionarias, los astrocitos forman canales que orientan y fomentan el crecimiento axónico. Al contrario de lo que sucede en el cerebro adulto, donde los astrocitos maduros inhiben el crecimiento axonal, como sucede en la cicatriz glial (Shu y Richards, 2001). Durante este proceso de migración en el que se producen interacciones adherentes astrocito-neurona, va cambiando el entorno espacial y temporalmente, lo que determina la posición final a la que cada neurona llegue (Stoeckli, 1997).

Se ha descubierto que, además de las neuronas, las células gliales regulan las sinapsis neuronales. En mamíferos, en los primeros días postnatales se forma un elevado número de sinapsis que vienen acompañadas por una generación de astrocitos, los cuales colaboran en la formación de estas sinapsis. Esto se debe a que los astrocitos: producen y secretan colesterol para la formación de nuevas membranas; secretan hormonas esteroideas que actúan como señales sinápticas y expresan agrina, que es una proteína que está implicada en la formación de sinapsis (Mauch *et al.*, 2001). Además, los astrocitos controlan la maduración de las sinapsis aumentando la densidad de receptores postsinápticos, gracias a la liberación de factores como el

factor de necrosis tumoral (TNF α) y el factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF) (Schwartz, 1992; Bilbo y Schwartz, 2009). Finalmente, las prolongaciones astrocitarias participan en la eliminación de la sinapsis, entrando en la hendidura sináptica, cerrando el contacto y sustituyendo la sinapsis por otra.

La neurogénesis en el cerebro adulto humano está localizada únicamente en el hipocampo y en la zona subventricular. En ambas regiones, las células madre que dan lugar a neuronas se consideran astrogiales al expresar GFAP, contactar con los vasos sanguíneos y expresar principalmente canales de K⁺. Los precursores que residen en estas dos regiones son multipotenciales, con capacidad para formar neuronas y glía. Por contra, la gliogénesis se produce en todas las regiones cerebrales, y la zona en la que se genere define el tipo de célula glial que se producirá (Goldman, 2003 y Horner y Palmer, 2003).

2) Estructural.

Los astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris controlan y reparten su territorio sin solaparse entre ellos, conectando con los vasos sanguíneos y las sinapsis neuronales (1-2 millones de sinapsis/astrocito). Las prolongaciones astrocitarias proporcionan el soporte necesario gracias al cual controlan la actividad transcurrida en su dominio (Lin y Bergles, 2004).

3) Vascular.

En el cerebro, las células endoteliales establecen numerosas uniones estrechas entre ellas, formando la barrera hematoencefálica primaria, separando los capilares sanguíneos y el parénquima cerebral, de forma que el flujo de sustancias se ve reducido. Además, los capilares sanguíneos están rodeados por las terminaciones astrocitarias (pies terminales), las cuales permiten el paso de sustancias.

Los astrocitos además, secretan factores solubles como el TGF- β y el GDNF, que favorecen la formación de uniones estrechas, y estimulan la polarización de la membrana luminal y basal de las células endoteliales, debido a la expresión de canales iónicos y proteínas involucradas en el transporte (Fédérici *et al.*, 1995). Las células endoteliales también señalizan a los astrocitos, secretando factores como el factor inhibidor de leucemia (LIF) que promueve la maduración astrocitaria. Esta maduración conlleva la expresión de receptores (Aquaporina 4) y canales iónicos (canales de K⁺) en la membrana de los astrocitos (Rubin y Staddon, 1999; Abbott *et al.*, 2006; Iadecola y Nedergaard, 2007).

La principal función de la barrera hematoencefálica es regular la entrada y salida de nutrientes y otras moléculas en el cerebro, de forma que solo pueden atravesar la barrera aquellas sustancias que sean hidrofóbicas o que dispongan de un transportador (glucosa y glutamato) (Staddon y Rubin, 1996; O'Kane *et al.*, 1999). Las células endoteliales poseen una permeabilidad selectiva gracias a los transportadores específicos que poseen en su membrana: transportadores de unión a adenina, transportadores de aminoácidos, transportadores de glucosa (GLUT1), e intercambiadores iónicos. Por otro lado, la membrana de las prolongaciones astrocitarias están enriquecidas con numerosos receptores, transportadores y canales que controlan la comunicación entre las células gliales y las endoteliales, y regulan la interfaz glía-vaso (figura 19). Por lo que, las sustancias que logran difundir al líquido extracelular a través del recubrimiento endotelial sufren una segunda selección por parte de los astrocitos. De esta forma, los astrocitos controlan la composición del espacio extracelular neuronal. Cada prolongación astrocitaria contacta con un capilar sanguíneo, formando unidades neurovasculares independientes (Rubin y Staddon, 1999; Abbott *et al.*, 2006; Iadecola y Nedergaard, 2007).

El intercambio de agua entre la sangre y el parénquima cerebral está regulado por las aquaporinas (canales de agua) concentradas en los terminales astrocitarios. Los astrocitos también regulan la entrada de agua mediante receptores de vasopresina (V_1), y por el sistema renina-angiotensina (Simard y Nedergaard, 2004).

Finalmente, se ha observado que señales de Ca^{2+} liberadas por la actividad neuronal, entran por las prolongaciones astrocitarias provocando la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores en los capilares, y como consecuencia, una regulación de la microcirculación cerebral (Iadecola y Nedergaard, 2007).

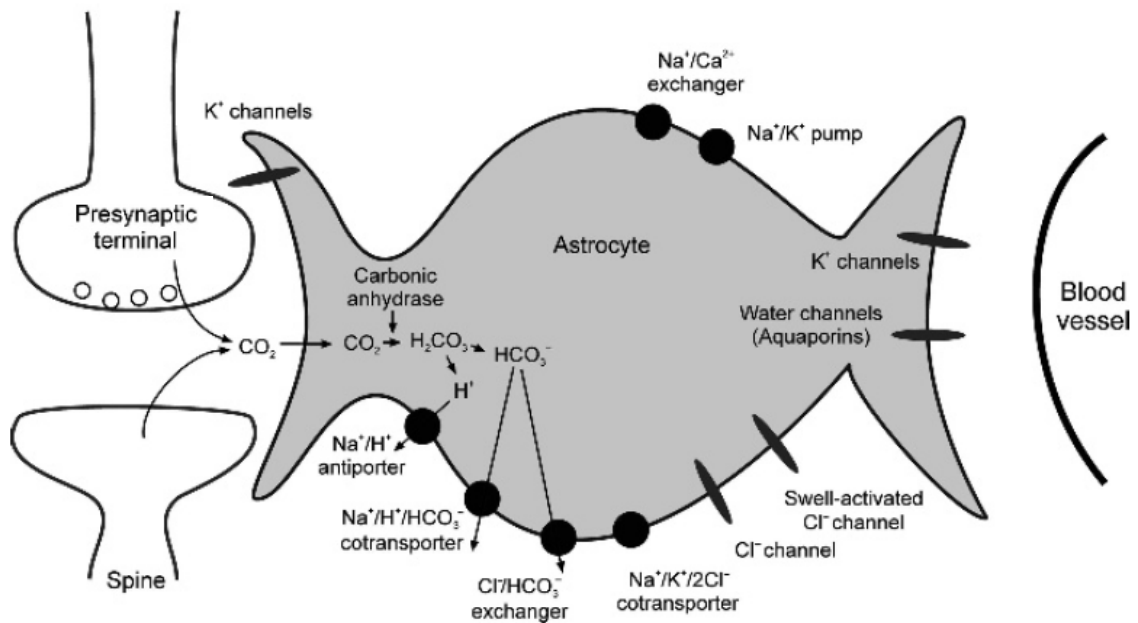


Figura 19. Función vascular de los astrocitos.

Los astrocitos con sus numerosos procesos, desempeñan una importante función vascular, regulando la nutrición de las neuronas a través de sus conexiones con los capilares sanguíneos. Además regulan la transmisión sináptica contactando con los terminales de los axones de las neuronas (Modificado de Verkhratsky y Butt, 2007).

4) Microambiental.

El control de la homeostasis iónica extracelular en el cerebro es muy importante para mantener el potencial de reposo y la excitabilidad de las neuronas. El espacio extracelular contiene concentraciones altas de Na^+ y Cl^- , y bajas de K^+ , mientras que las células neurales contienen en el citoplasma concentraciones altas de K^+ , y bajas de Na^+ y Cl^- . Este gradiente iónico se consigue gracias a múltiples sistemas de transporte iónico, bien por difusión (canales iónicos) o bien a expensas de consumo de energía (bombas e intercambiadores iónicos). Las neuronas transmiten señales a la astrogliá mediante la liberación de K^+ durante el impulso nervioso. Por su parte, los astrocitos regulan la concentración extracelular de K^+ mediante canales de K^+ y transportadores o bien con su “tamponamiento espacial” (figura 20). Este último consiste en que el K^+ que entra en la célula se distribuye por toda la red astrocitaria por corrientes intracelulares a través de uniones GAP. Esta captación por parte de los astrocitos se produce para proteger a las neuronas de las altas concentraciones de K^+ extracelulares lo que impediría la aparición de una nueva actividad eléctrica (Vernardakis, 1996). Posteriormente, el K^+ se excreta en la zona intersticial que acabará saliendo al torrente sanguíneo o lo devuelven a las neuronas en un proceso que consume energía (Kofuji y Newman, 2004; Amédée *et al.*, 1997).

Las concentraciones intracelulares de Cl^- son bajas en neuronas pero elevadas en astrocitos, ya que para regular el intercambio entre Na^+ y K^+ utilizan transportadores de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Walz, 2002).

La concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular es baja y todavía más en el citoplasma. Por ello, una bajada de la concentración extracelular de Ca^{2+} provoca una liberación en el retículo endoplasmático de los astrocitos, llegando al espacio extracelular mediante intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Deitmer *et al.*, 1998). Además poseen sistemas de captación de Ca^{2+} que luego pueden transportar por las uniones tipo GAP. Regulando la homeostasis del Ca^{2+} los astrocitos son capaces de modular la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica (Deitmer *et al.*, 1998).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y su concentración extracelular debe ser siempre muy baja ya que es altamente neurotóxico (Pasti *et al.*, 1995). Los astrocitos regulan la concentración de glutamato extracelular delimitando espacialmente las sinapsis glutamatérgicas y sellando la hendidura sináptica. Además, el glutamato liberado, es capturado rápidamente por los transportadores de glutamato presentes en las membranas de los astrocitos (Glut1) (Hertz *et al.*, 1999) esta captación está asociada al transporte de $2-3\text{Na}^+/\text{glutamato}$, por lo que, la captura de glutamato produce un incremento en los niveles de Na^+ intracelulares. Finalmente, los astrocitos metabolizan el glutamato captado en glutamina (forma no neurotóxica) mediante la glutamina sintasa, y la liberan para que sea captada de nuevo por el terminal presináptico neuronal para ser transformada de nuevo en glutamato (Magistretti y Pellerin, 1999).

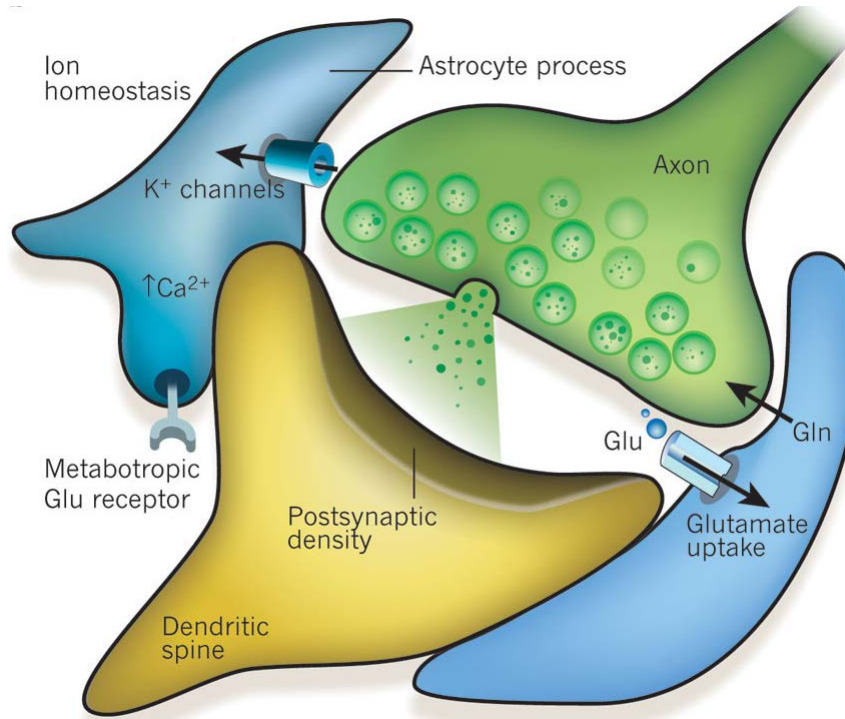


Figura 20. Función microambiental de los astrocitos.

Los astrocitos se encargan de mantener la homeostasis extracelular, regulando los niveles de iones, neurotransmisores y demás moléculas reguladoras hasta conseguir unas concentraciones que permitan el correcto funcionamiento de la transmisión sináptica (Eroglu y Barres, 2010).

5) Metabólico.

El cerebro produce la energía que necesita mediante la oxidación de la glucosa que recibe del torrente sanguíneo. La glucosa es capturada por los transportadores de glucosa (GLUT1) existentes en las células endoteliales y a continuación secretada al espacio intersticial. Posteriormente, se acumula en las células neurales a través de los transportadores de glucosa (GLUT3 en neuronas y GLUT1 en astrocitos). Con el fin de mantener los gradientes iónicos transmembrana, las neuronas consumen el 90% de la energía y las células gliales únicamente el 10%, aunque la acumulación de glucosa es igual en ambas células. Para llevar a cabo este proceso, es necesaria la utilización de un intermediario de la glucosa, el lactato, que es sintetizado en las células gliales y transportado a las neuronas (figura 21). Esta vía se conoce como la glicólisis aeróbica, donde la glucosa pasa primero a piruvato y posteriormente a lactato. Este proceso se lleva a cabo a través de la enzima lactato deshidrogenasa 5 (LDH5) y está estrechamente ligada a la acumulación y procesamiento del glutamato. Tras la activación neuronal se libera glutamato, y la captación de glutamato por los astrocitos estimula la entrada de glucosa a través de los pies terminales y produce un incremento intracelular de Na⁺, que es secretado mediante bombas Na⁺/K⁺ ATPasa activadoras de la enzima fosfoglicerato quinasa (PGK) que estimula la producción de lactato. Posteriormente, el lactato es liberado por los astrocitos y capturado por las neuronas mediante dos transportadores de monocarboxilatos

(MCT-1, en astrocitos; MCT-2, en neuronas). Una vez en las neuronas, el lactato es convertido en piruvato por la LDH1 y utilizado como principal sustrato para producir energía en el ciclo de Krebs (TCA). El sistema está regulado por la demanda neuronal de energía, por lo que los transportadores de glucosa presentes en los astrocitos (GLUT1) incrementan su captación gracias a la estimulación producida por el glutamato secretado en la sinapsis (Pellerin *et al.*, 2007).

El glucógeno en el cerebro se almacena exclusivamente en los astrocitos (Pellerin *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la estimulación intensa del SNC promueve la glucogenólisis, movilizándose el glucógeno para transformarse en glucosa y finalmente a lactato para hacer frente a la demanda energética. De esta manera, los astrocitos regulan su nivel energético durante la actividad cerebral (Magistretti y Pellerin, 1999; Deitmer, 2000).

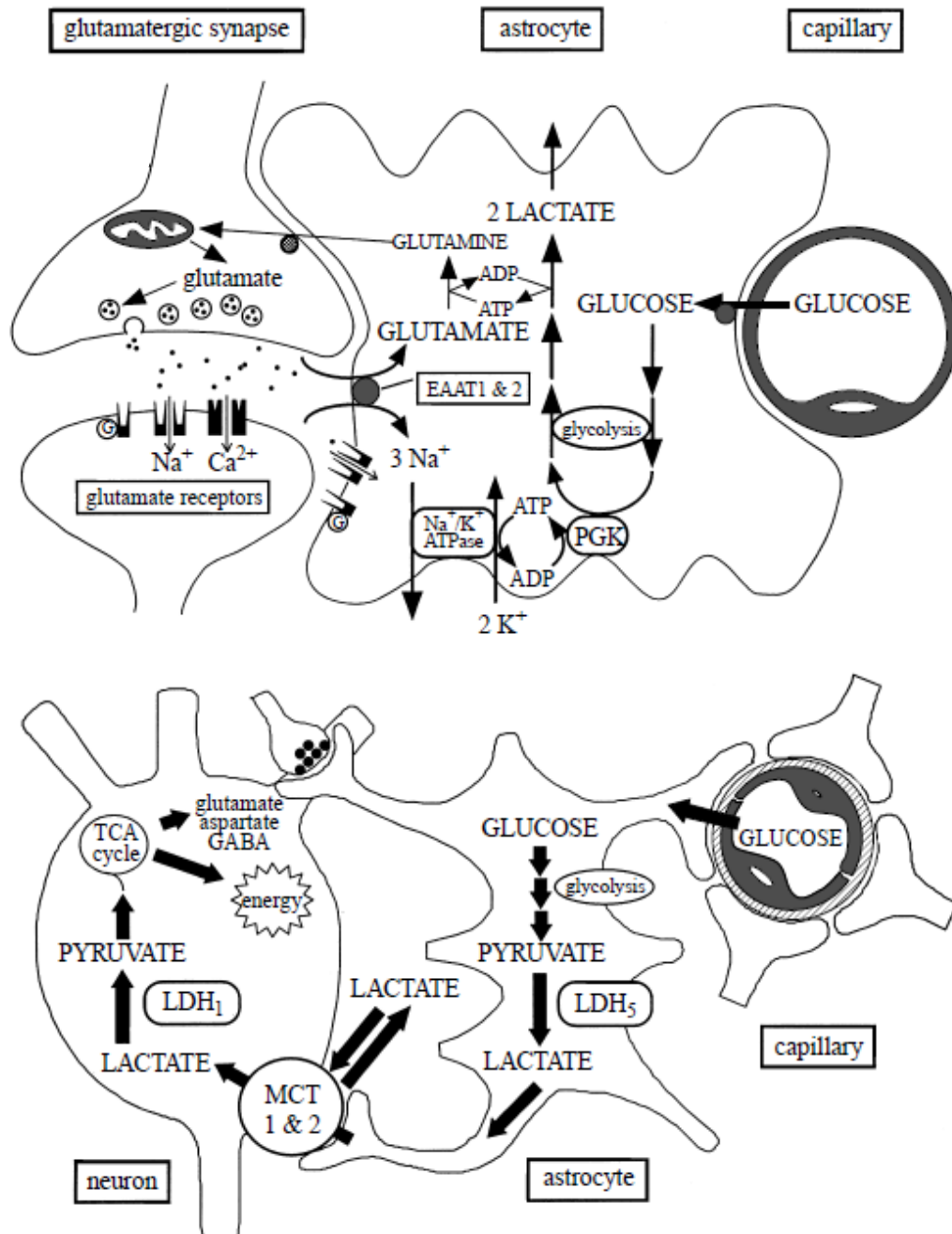


Figura 21. Esquema del acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos.

Los astrocitos se encargan de proporcionar las moléculas energéticas a las neuronas para que estas puedan ejercer su función correctamente. Para ello, los astrocitos están conectados íntimamente tanto con los capilares de los que extrae glucosa y oxígeno, como con las neuronas a las que le proporciona de todos los metabolitos, ejerciendo de intermediario en ese proceso (Magistretti, 1999).

6) Señalización.

Los astrocitos juegan un papel muy importante en la regulación de la sinapsis controlando la concentración de neurotransmisores en la hendidura sináptica. En el caso de los aminoácidos (glutamato, GABA, etc.), a través de transportadores gliales específicos. En las sinapsis colinérgicas, los astrocitos sintetizan y secretan proteínas de unión a acetilcolina

atenuando así la señal sináptica. Por otro lado, los astrocitos controlan la sinapsis mediante gliotransmisores, que tienen efectos sobre las sinapsis como por ejemplo, la liberación de glutamato puede activar la secreción de GABA en interneuronas conectadas a neuronas piramidales. Por último, los astrocitos modulan la transmisión sináptica liberando ATP, que inhibe las sinapsis glutamatérgicas a través de la catálisis de ATP a adenosina y actuando sobre los receptores de adenosina (Auld y Robitaille, 2003; Allen y Barres, 2005; Pascual *et al.*, 2005; Halassa y Haydon, 2010).

Por la participación de los astrocitos en la sinapsis, se creó un nuevo concepto de organización sináptica conocido como “sinapsis tripartita”. En estas sinapsis, participan el terminal presináptico de la neurona, la membrana postsináptica neuronal y el astrocito. Los neurotransmisores se liberan del terminal presináptico y activan los receptores en la membrana postsináptica neuronal y perisináptica astrogliar. Esto genera un potencial postsináptico en las neuronas y señales de Ca^{2+} en los astrocitos. Esta señal de Ca^{2+} se puede propagar y puede liberar gliotransmisores que irán dirigidos a los terminales neuronales pre y postsinápticos. De esa forma, en las sinapsis tripartitas existe una comunicación bidireccional entre las neuronas y los astrocitos (Araque *et al.*, 1999; Volterra y Meldolesi, 2005).

A continuación en la tabla 12 se resumen las principales funciones de los astrocitos en el sistema nervioso central.

Funciones de los astrocitos en el SNC

Regulación homeostática del microambiente neural

Tamponador iónico extracelular:

- Limpieza por captación del exceso de iones K^+ extracelulares; distribución de iones a través del sincitio astrocítico.
-

Captación y liberación de neurotransmisores:

- Captación de glutamato y GABA con alta afinidad mediante los transportadores de membrana plasmática.
 - Liberación de glutamato y ATP vesicular independiente de Ca^{2+} .
-

SopORTE Metabólico:

- Captación y metabolismo de glutamato en glutamina para redistribuirlo a las neuronas.
 - Captación de glucosa vía transportador GLUT1 localizado en los pies vasculares.
 - Regulación de las respuestas metabólicas neuronales vía: glucógeno astrocítico (almacén de glucosa a corto plazo) y lactato (liberado a las neuronas como sustrato energético).
-

Barrera hematoencefálica:

- Regula la inducción, mantenimiento y permeabilidad de la barrera hematoencefálica (formación de uniones estrechas, expresión de varios sistemas de transporte y secreción de moléculas).
-

Desarrollo neural

Neurogénesis:

- Células que expresan GFAP en la SVZ o SGZ pueden contribuir a la generación de ambos tipos celulares, células madre y componentes neurales del nicho neurogénico.
-

Regulación sináptica

Modulación de la transmisión sináptica y la actividad neuronal:

- Liberación de glutamato de los astrocitos modula la transmisión sináptica por activación de los receptores glutamatérgicos pre y postsinápticos.
 - Mecanismos de generación de señales dentro de redes neuronales vía ondas de calcio.
-

Sinaptogénesis:

- Promueve la sinaptogénesis entre las neuronas del sistema nervioso central por la liberación de moléculas difusibles.
-

Plasticidad sináptica:

- Modula la función sináptica a través de su función en la recaptación de glutamato de las sinapsis por la acción del transportador de aminoácidos excitadores (EAATs).
 - Modula la activación y la duración de la actividad sináptica (provocando la liberación de glutamato para LTP, preservación de la intensidad sináptica por liberación de $TNF\alpha$).
-

Otras funciones

Vasomodulación:

- Coordina el flujo de sangre al cerebro (hiperemia funcional).
 - Control de la glucosa y O_2 en sangre por señalización mediado por neurotransmisor (principalmente por glutamato).
 - Secreción de agentes vasoactivos que inducen vasoconstricción o vasodilatación (correlacionado con el incremento de Ca^{2+} intracelular).
-

Detoxificación:

- Prevención de la muerte neuronal por excitotoxicidad capturando el exceso de amonio y glutamato (convirtiéndolo en glutamina).
 - Captación de metales pesados o tóxicos.
-

Activación inmune:

- Puente entre el sistema inmune y el SNC: a) Expresa MHC II y estimula moléculas importantes para la activación de células T y presentación de antígenos; b) Expresa receptores implicados en la
-

inmunidad innata; y c) Secreta una amplia variedad de citoquinas y quimioquinas que actúan como mediadores inmunes.

Tabla 12. Funciones de los astrocitos en el SNC.

Tabla resumen donde se muestran las diferentes funciones de los astrocitos en SNC (Modificado de Jacobs, 2012).

3.5 Los astrocitos y el zinc exógeno.

El zinc es un oligoelemento esencial y fundamental para un gran número de funciones; por lo que su homeostasis en el cerebro, y otros órganos, ha sido muy estudiado (Bitanhirwe y Cunningham, 2009).

En el SNC, algunas neuronas acumulan iones de zinc dentro de las vesículas sinápticas (Frederickson y Danscher, 1990), el "zinc sináptico", liberado conjuntamente con el glutamato durante la transmisión sináptica. En el espacio extracelular, los iones de zinc modulan distintos tipos de receptores, incluyendo los receptores ácido alfa amino-3 hidro-5 metil-4 isoxazol propiónico (AMPA), los receptores de kainato, los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), los receptores ácido γ -aminobutírico (GABA) y los canales iónicos dependientes de voltaje (Frederickson *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 2006; Smart, 2004; Takeda *et al.*, 2004). De esta forma, el zinc sináptico puede ejercer un efecto balsámico para evitar la posterior excitotoxicidad. Sin embargo, la presencia excesiva de zinc libre en el espacio extracelular, puede inducir la muerte neuronal (Kim *et al.*, 1999, Frederickson *et al.*, 2005). Éste es precisamente el motivo por el que el tejido nervioso debe regular los niveles extracelulares de zinc y mantener la homeostasis del zinc en el SNC. Esta función es llevada a cabo por los astrocitos, principalmente debido a su menor sensibilidad al daño tóxico por el zinc en comparación con las neuronas (Dineley *et al.*, 2000; Sheline *et al.*, 2004), su capacidad para captar el zinc extracelular (Varea *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009), y su capacidad para quelar el zinc extracelular por la liberación de metalotioneínas.

Los astrocitos juegan un papel clave en la protección del cerebro contra las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales se cree que son un factor importante en la neurodegeneración (Liddell *et al.*, 2006; Mattson y Magnus, 2006) y en las enfermedades. Las mitocondrias funcionan como una reserva intracelular de zinc, capturando el Zn^{2+} citosólico en condiciones de reposo (Colvin *et al.*, 2006) y durante ciertos estados patológicos, como por ejemplo, accidentes cerebrovasculares, convulsiones o episodios isquémicos, donde se libera Ca^{2+} al citoplasma (Sensi *et al.*, 2003). Este zinc libre en la célula, puede desencadenar la producción de ROS a través de diferentes vías (Bossy-Wetzel *et al.*, 2004). Estudios en mitocondrias aisladas han demostrado que el Zn^{2+} inhibe la respiración celular interfiriendo con la actividad del complejo III de la cadena de transporte de electrones (Gazaryan *et al.*, 2007). De

esta manera, el zinc podría interferir en la función mitocondrial, desencadenando la muerte celular (Sensi *et al.*, 2000).

Existen estudios que muestran que mientras los astrocitos son menos vulnerables que las neuronas a los efectos tóxicos de Zn^{2+} (Koh y Choi, 1994; Yokoyama *et al.*, 1986), los astrocitos son vulnerables a la toxicidad resultante tanto de la captura como de la acumulación del Zn^{2+} liberado durante la sinapsis (Lee y Koh, 2010; Varea *et al.*, 2006), por ejemplo, durante los episodios de excitotoxicidad como los que se producen en los derrames cerebrales (Stork y Li, 2009). La captación de Zn^{2+} extracelular en astrocitos se produce por endocitosis, como se demuestra por el uso de inhibidores de endocitosis, y es capturado posteriormente por las proteínas de unión de zinc o incorporado dentro de mitocondrias (Sensi *et al.*, 2003), lisosomas (Colvin *et al.*, 2010) o zincosomas (Beyersmann y Haase, 2001; Varea *et al.*, 2006; Ballestin *et al.*, 2011).

Las vías moleculares implicadas en la muerte celular inducida por Zn^{2+} en astrocitos, se sabe que está implicada en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo a cascadas de PKC y Ras/Raf/ERK (Chang *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2011). Del mismo modo, los niveles y la activación de la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA2) se conoce que aumentan después de una lesión cerebral (Gabryel *et al.*, 2007) y está asociada con la muerte de astrocitos inducida por isquemia (Gabryel *et al.*, 2007; Stephenson *et al.*, 1999). Es sabido que, tanto la glucosa y como el zinc pueden regular la cPLA2 (Lindahl y Tagesson, 1996), y recientemente han sido implicados en el daño a astrocitos en el contexto de la hiperglucemia post-ictus. La acción directa del zinc en astrocitos en cultivo provoca una reducción de la glutatión reductasa y ésta al agotarse totalmente, conduce a una pérdida de la capacidad antioxidante y la inducción del estrés oxidativo (Ralph *et al.*, 2010; Ryu *et al.*, 2002).

Se produce una inflamación de los astrocitos en una fase temprana y crítica del cerebro tras el edema resultante de un derrame cerebral, lesión cerebral traumática, o disfunción hepática que produce a aumento tóxico en los niveles de NH_4 . La inflamación astrocítica desencadenada osmóticamente o por el aumento del NH_4 , es seguido por un aumento de la concentración de Zn^{2+} intracelular, que puede ser bloqueado por inhibidores de la NO sintetasa, indicando que el Zn^{2+} intracelular es liberado por una nitrosilación excesiva (Kruczek *et al.*, 2009). Este aumento Zn^{2+} no mata los astrocitos, sino más bien desencadena la expresión de MTF-1 y MT. El MTF-1 es un regulador de varios genes metalhomeostáticos incluyendo los miembros de la familia ZnT así como MT que pueden tamponar metales pesados tanto en células gliales como neuronales, y con ello contrarrestar el estrés oxidativo y la inflamación.

La capacidad tamponadora de las MT en los astrocitos se demostró mediante la sobreexpresión de esta proteína en astrocitos cultivados y registrando su efecto tanto en la

translocación de Zn^{2+} como en el Zn^{2+} liberado por la exposición de las células a un agente oxidante. El aumento de la captación de Zn^{2+} se representa por la sobreexpresión de MT, sin embargo, también aumentó la concentración de zinc intracelular bajo condiciones oxidativas y de estrés (Malaiyandi *et al.*, 2004).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El zinc es un elemento traza esencial que es crítico para un gran número de proteínas estructurales, procesos enzimáticos y factores de transcripción. Además participa en multitud de funciones celulares y tisulares básicas, y en el cerebro, los iones de zinc están implicados en la transmisión sináptica. Por lo que, la homeostasis del zinc es crucial para la supervivencia y función de las células, ya que la deficiencia de zinc está presente en muchos problemas fisiológicos y de salud, afectando a la mayoría de los órganos del cuerpo, incluido el cerebro. Las células han desarrollado una amplia variedad de sistemas para regular la concentración de zinc y, concretamente en el sistema nervioso, los astrocitos juegan un papel importante en la homeostasis del medio neuronal, regulando diferentes parámetros para el correcto funcionamiento de la transmisión sináptica, entre los que se encuentran los niveles de zinc. Alteraciones en la concentración de zinc libre se han relacionado con la disfunción cerebral. Individuos con síndrome de Down, presentan alteraciones en la concentración de zinc libre y en algunas de las proteínas relacionadas con la homeostasis del zinc. Lo mismo sucede con individuos que padecen el Síndrome Alcohólico Fetal, ya que el consumo crónico y agudo de etanol es probablemente una de las circunstancias más frecuentes que intervienen en el déficit de zinc. Se ha propuesto el suplemento de zinc en la dieta como un posible método para atenuar la deficiencia de zinc.

Por tanto, dado el papel de los astrocitos en el mantenimiento general de la homeostasis en el SNC y los déficits de zinc encontrados, la hipótesis que planteamos es que, los astrocitos en el SAF y en el SD tendrán alterada su capacidad de manipulación del zinc en condiciones normales y durante la exposición a zinc extracelular.

OBJETIVOS

Utilizando cultivos primarios de astrocitos, se pretende confirmar lo expuesto en nuestra hipótesis. Así, nuestros objetivos de trabajo serán:

1. Determinar los parámetros más adecuados para el estudio de la captación de iones zinc extracelulares en cultivos de astrocitos, como la concentración de zinc y el tiempo de exposición.
2. Analizar la distribución de zinc en cultivos de astrocitos de los modelos de SAF y SD en condiciones basales, en comparación con sus controles correspondientes.
3. Estudiar la capacidad de manipulación del zinc mediante el análisis de su captación del medio extracelular, en cultivos de astrocitos de los modelos de SAF y SD.
4. Determinar ultraestructuralmente la naturaleza de los zincosomas.
5. Estudiar los mecanismos implicados en las posibles alteraciones de la movilización del zinc extracelular en estos modelos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Para conseguir los objetivos planteados hemos seguido la siguientes estrategias: Como modelo experimental hemos elegido el cultivo primario de astrocitos, obtenidos a partir de ratas Wistar y de ratones Ts65Dn, porque estos modelos de cultivos celulares están afianzados como modelos *in vitro* y han sido utilizados para el estudio del zinc en células nerviosas (Tomás *et al.*, 2002; Braza-Boïls *et al.*, 2006; Varea *et al.*, 2006). Se han empleado técnicas de microscopía de fluorescencia, técnicas autometalográficas, técnicas de microscopía electrónica y de silenciamiento génico, que nos han permitido estudiar la localización del zinc tanto a nivel celular como subcelular.

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se llevaron a cabo experimentos con dos modelos animales:

A) Ratas Wistar.

Se utilizaron ratas Wistar, proporcionados por el Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot de la Universidad de Valencia, habiéndose mantenido estabulados bajo condiciones constantes de temperatura (22-24°C), humedad (55-60%), ciclos de luz/oscuridad (12/12 horas) y se les proporcionó pienso y agua *ad libitum*. Se utilizaron machos y hembras, indistintamente, recién nacidos (P0). En total se realizaron 16 cultivos primarios de astrocitos de rata y se utilizaron 34 neonatos.

B) Ratones Ts65Dn.

Se utilizaron ratones Ts65Dn (Davisson *et al.*, 1990), como modelo experimental para el síndrome de Down (SD). Este es un modelo de trisomía segmental, porque contiene un fragmento (34 Mb) del cromosoma 16 de ratón que es ortólogo al brazo largo del cromosoma 21 humano. Este segmento contiene aproximadamente 140 genes, muchos de los cuales están altamente conservados entre los ratones y los seres humanos (Gardiner *et al.*, 2003).

La generación parental de estos animales se obtuvo de la colonia de investigación de Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Las camadas fueron generadas por retrocruzamientos repetidos entre los ratones machos controles (B6EiC3) y hembras trisómicas (Ts65Dn). Tanto la generación parental como las camadas producidas fueron mantenidas en el Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot de la Universidad de Valencia. En total se realizaron 9 cultivos primarios de astrocitos de ratón y se utilizaron 71 neonatos.

Todos los experimentos con animales fueron realizados de conformidad con la Directiva 2010/63/UE del consejo de la Comunidad Europea para el Bienestar y Uso de Animales de Laboratorio, y del Real Decreto 53/2013 del gobierno español sobre la protección de los

animales utilizados para fines científicos. Y fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Valencia a la hora de solicitar los proyectos de investigación entre los cuales se enmarca este trabajo. Se ha hecho todo lo posible para reducir al mínimo el número de animales utilizados y su sufrimiento.

2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS Y TRATAMIENTOS.

En la realización de este estudio se ha utilizado un modelo *in vitro* de cultivos celulares de astrocitos y neuronas tras 7 y 14 días de cultivo respectivamente. Este modelo de uso habitual, permite controlar y manipular tanto las células como sus condiciones ambientales, lo que resulta fundamental para conocer los mecanismos que subyacen en la acción tóxica del alcohol y en la manipulación de zinc llevada a cabo por dichas células.

En estudios previos, tras la exposición al etanol, las células no se veían afectadas externamente por los tratamiento (Tomás *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010), las células mostraban una correcta morfología y estaban bien extendidas sobre la placa/cubreobjetos de cultivo. No se produjo una aparente pérdida de viabilidad celular ni una inhibición en la proliferación celular. De igual modo, los astrocitos de los ratones trisómicos no mostraban alteraciones morfológicas ni estructurales en comparación a los controles.

Por estos motivos, este modelo parece ser un buen candidato para estudiar tanto la captación de zinc, como una aproximación a las condiciones *in vivo* tras el daño tóxico producido por la exposición crónica al etanol, como ya se ha observado anteriormente (Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2002), así como la alteración en el síndrome de Down.

2.1 Cultivo primario de astrocitos.

Los cultivos de astrocitos se realizaron según la técnica descrita por Renau-Piqueras *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Se utilizaron ratas Wistar y ratones Ts65Dn, en ambos casos, neonatos de 0 días postnatal (P0).

- 1- Se sacrifican mediante dislocación cervical y posteriormente se decapitan para la extracción de los hemisferios cerebrales en condiciones estériles (campana de flujo laminar vertical Two 30, Faster) y tras eliminar la piel y el cráneo.
- 2- Para eliminar los restos de meninges y células sanguíneas, los hemisferios se lavan con HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} a 4°C estéril (solución salina balanceada de Hank, 14170, Life Technologies).
- 3- Se colocan los hemisferios en un tubo de centrifuga con 3 ml de HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , se disgregan mecánicamente por aspiración con una pipeta de 1 ml, se repite el proceso durante 10 veces hasta obtener una suspensión homogénea.

- 4- Se añaden 6 ml de HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} (24020, Life Technologies) al tubo de centrifuga y tras homogeneizar, se deja sedimentar durante 3 minutos.
- 5- Se recoge el sobrenadante y se agita en un vortex a máxima velocidad durante 1 minuto para eliminar neuronas.
- 6- La suspensión se pasa por una membrana de nailon con un tamaño de poro de 80 μm , para eliminar los restos de meninges y fragmentos de tejido.
- 7- Se centrifuga la suspensión durante 3 minutos a 125g.
- 8- Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspende y diluye a razón de 20 ml/cerebro, en medio de cultivo completo que se describe a continuación (Miñana *et al.*, 1998; Renau-Piqueras *et al.*, 1989):

Medio completo de cultivo para astrocitos (100 ml):

- 93 ml de DMEM + 4,5 g/l de D-glucosa (ECB7501, Euroclone).
- 5 ml de suero bovino fetal (SBF, 10270, Life Technologies).
- 1 ml de PSS (10.000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina, P4333, Sigma-Aldrich).
- 1 ml de L-glutamina (200 mM, G7513, Sigma-Aldrich).

- 9- La suspensión se siembra sobre cubreobjetos de vidrio esterilizados, colocados en placas de Petri de 60 mm de diámetro, con un volumen final de 3,5 ml de medio completo.
- 10- Las placas se mantienen en un incubador (Heraeus Hera Cell 150, Kendro) con una atmósfera húmeda, un 5% de CO_2 y 95% de aire, a 37°C.

El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días por medio nuevo. Bajo estas condiciones de incubación, los astrocitos crecen rápidamente durante 7 días, donde alcanzan su periodo de máxima proliferación (Lu *et al.*, 1991; Vallés *et al.*, 1994). Tras este periodo de proliferación comienza otro de diferenciación, en el cual la división celular disminuye (Renau-Piqueras *et al.*, 1989) y aumenta la heterogeneidad del cultivo.

La pureza del cultivo de astrocitos se evaluó mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra GFAP (G3893, Sigma-Aldrich) (Renau-Piqueras *et al.*, 1989), que marca astrocitos, y la evaluación de las características morfológicas de las células se llevó a cabo mediante microscopía de contraste de fases. La posible contaminación por neuronas, se evaluó utilizando un anticuerpo monoclonal contra MAP-2 (M1406, Sigma-Aldrich) específico para dichas células (Braza-Boils *et al.*, 2006). Bajo nuestras condiciones de cultivo, el porcentaje de astrocitos superó el 95% de pureza. Los ensayos con astrocitos se realizaron a los 7 días *in vitro*.

2.2 Cultivo primario de neuronas.

Los cultivos primarios de neuronas fueron preparados a partir de fetos de ratas de 16 días de gestación (E16) según la técnica descrita por Braza-Boils *et al.* (2006) y Brewer *et al.* (1993) con algunas modificaciones.

- 1- Se incuban las placas Petri y los cubreobjetos con poly-D-lisina (P7280, Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,05 mg/ml en agua destilada en el incubador durante 24 horas a 37°C.
- 2- Se lavan las placas y los cubreobjetos con PBS a 37°C y se dejan en este tampón hasta su uso.
- 3- Se sacrifica, mediante dislocación cervical, la rata preñada, se extrae el útero bicornio con los fetos y se colocan sobre una placa Petri con PBS a 4°C.
- 4- Tras la decapitación de los fetos, se extraen los hemisferios cerebrales en condiciones estériles tras haber eliminado la piel y el cráneo.
- 5- Los hemisferios cerebrales se colocan sobre una placa Petri con PBS a 4°C donde se eliminan los restos de meninges y las células sanguíneas.
- 6- Los hemisferios se depositan en tubos de centrifuga (10 hemisferios/tubo) con medio de disgregación, compuesto por HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , suplementado con 1 mM de piruvato sódico (11360-070, Gibco) y 10 mM de HEPES pH 7,4 (H3784, Sigma-Aldrich), a razón de 1 ml/feto.
- 7- Se disgregan los hemisferios mecánicamente, pipeteando 10 veces hasta obtener una suspensión homogénea.
- 8- A la suspensión se añade medio compuesto por HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} , suplementado con 1 mM de piruvato sódico y 10 mM de HEPES pH 7,4, a razón de 2 ml/feto.
- 9- Se deja sedimentar durante 3 minutos.
- 10- Tras decantar el sobrenadante por aspiración y transferirlo a los tubos de centrifuga, se centrifuga durante 3 minutos a 200g.
- 11- Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspende y diluye a razón de 6 ml/feto en medio completo de cultivo, como se describe a continuación:

Medio completo de cultivo para neuronas (100 ml):

- 95,75 ml de Neurobasal (21103-049, Gibco).
- 2 ml de B27 (50x/100 ml, 17504, Gibco)
- 1 ml de PSS (10.000 U/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina, P4333, Sigma-Aldrich).
- 250 µl de glutamato (10 mM, G5889, Sigma-Aldrich).
- 1 ml de GlutaMAX™ (200 mM, 35050, Life Technologies).

- 12- Se elimina el PBS de las placas y los cubreobjetos, y se siembra la suspensión a razón de 3,5 ml/placa de medio completo para las placas de Petri de 60 mm de diámetro.

13- Las placas se mantienen en un incubador (Heraeus Hera Cell 150, Kendro) con una atmósfera húmeda, un 5% de CO₂ y 95% de aire, a 37°C.

El medio de cultivo se cambia cada 2-3 días por medio completo nuevo. El GlutaMAX solo se utilizó desde el día de la siembra hasta el momento en que se hizo el segundo cambio de medio.

La pureza del cultivo de neuronas se evaluó también mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal contra MAP-2 (M1406, Sigma-Aldrich) y un anticuerpo policlonal contra NF (4142, Sigma-Aldrich) (Braza-Boils *et al.*, 2006), y la evaluación de las características morfológicas de las células se llevó a cabo mediante microscopía de contraste de fases. La posible contaminación por células astrogiales se determinó usando un anticuerpo contra GFAP específico para dichas células. Bajo nuestras condiciones de cultivo, el porcentaje de neuronas superó el 95% de pureza. Los ensayos con neuronas se realizaron a los 14 días *in vitro*.

2.3 Tratamiento con etanol.

Para estudiar el efecto de la exposición al etanol sobre la captación de zinc, se añadió etanol al medio de cultivo y se ajustó a una concentración final de 30 mM (138 mg/dl), que es la dosis equivalente a la concentración de etanol en sangre encontrada en mujeres en estado de gestación que beben de forma crónica (Eckardt *et al.*, 1998).

Para mantener la dosis de etanol, el medio de cultivo fue reemplazado cada 2 días. La concentración de etanol en el medio de cultivo fue comprobada usando un kit comercial (N7160, Sigma-Aldrich). La evaporación del etanol después de 24 horas fue del 10-20%.

En algunos cultivos, la morfología se evaluó por observación al microscopio óptico y el posible efecto citotóxico de la exposición de las células al etanol fue también evaluado con mediciones de la liberación de lactato deshidrogenasa al medio de cultivo por las células utilizando un kit comercial de ensayo de citotoxicidad (Pascual *et al.*, 2003).

2.4 Captación de zinc exógeno.

Para probar la capacidad de los astrocitos para capturar zinc exógeno, se probaron distintos tratamientos y los mejores resultados se obtuvieron cuando las células fueron incubadas en medio DMEM base que contenía 50 µM ZnSO₄ durante 10 minutos en la estufa incubadora de células, seguidamente fueron lavadas con medio nuevo. Este tratamiento fue habitualmente precedido por la quelación del zinc iónico celular con 25 µM TPEN (N,N,N',N'-

tetraquis(2-piridilmetil)etilendiamina; T1210, Life Technologies) durante 20 minutos, con el objetivo de eliminar el zinc disponible en la célula y ayudar a la captación de zinc extracelular.

Estudio de captación de zinc:

- 1- Lavado de los astrocitos con DMEM base.
- 2- Las células se incuban con 25 μ M TPEN en DMEM base durante 20 minutos a 37°C.
- 3- Se lavan las células con DMEM base.
- 4- Se incuban las células con 50 μ M ZnSO₄ en DMEM base durante 10 minutos a 37°C.
- 5- Se lavan las células con DMEM base.

2.5 Fijación.

Para fijar las células en cultivo, se utilizaron diversos protocolos de fijación y postfijación, según se indica en cada caso. Para la preparación de los distintos fijadores se utilizaron diferentes tampones que se detallan a continuación.

Tampones utilizados:

- Tampón fosfato (PB), solución stock (0,2 M) pH 7,4:
 - 22,72 g de Na₂HPO₄ (PM 141,96 g/mol) (106586, Merck).
 - 4,8 g de NaH₂PO₄ (PM 120 g/mol) (106370, Merck).
 - Disolver en agua destilada y enrasar hasta 1 litro.
- Tampón fosfato (PB), solución de trabajo (0,1 M) pH 7,4:
 - Mezclar en proporción 1:1, tampón PB 0,2 M y agua destilada.
- Tampón fosfato salino (PBS), solución de trabajo (0,01 M) pH 7,4:
 - 50 ml PB 0,2 M.
 - 9 g NaCl (27800, Rectapur).
 - Añadir agua destilada y enrasar hasta 1 litro.

2.5.1 Fijadores.

Las monocapas de células se fijaron, según el experimento, con las distintas soluciones fijadoras durante 30 minutos a 4°C:

Soluciones fijadoras (100 ml):

- Paraformaldehído (PFA), solución stock (8%):
 - 4 g de PFA (818715, Merck).
 - 100 ml agua destilada.
 - Agitar en placa calefactora hasta su disolución.

- Sumergir una lenteja de NaOH (141687, Panreac) durante unos segundos hasta que la solución se vuelva transparente.
- Dejar enfriar, alicuotar y congelar hasta su uso.
- Paraformaldehído 4% (PFA 4%):
 - 50 ml de PFA 8% en agua.
 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
- Glutaraldehído 4% (GA 4%):
 - 8 ml de GA 50% (15A807, Panreac).
 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
 - 42 ml de agua destilada.
- Paraformaldehído 1% y glutaraldehído 1% (PFA 1%-GA 1%):
 - 2 ml de GA 50%.
 - 12,5 ml de PFA 8% solución stock.
 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
 - 35,5 ml de agua destilada.

2.5.2 Postfijadores.

Las monocapas de astrocitos que se destinaron al estudio morfológico al microscopio electrónico o con autometalografía, tras la fijación, se postfijaron para su posterior inclusión en resina o revelado.

Soluciones de postfijación:

- NTS (*Neo-Timm solution*, Danscher *et al.*, 1981)
 - 0,1 g de Na₂S (208043, Sigma-Aldrich).
 - 6 ml de GA 50%.
 - 50 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4.
 - 44 ml de agua destilada.
- Tetróxido de osmio 2% (OsO₄ 2%) recién disuelto:
 - 0,1 g de tetróxido de osmio (O011, TAAB).
 - 5 ml de agua destilada.

3. MARCADORES DIRECTOS DE ZINC IÓNICO Y ORGÁNULOS CELULARES.

Se utilizaron métodos directos para detectar el zinc y orgánulos celulares y poderlos estudiar *in vivo* tanto por fluorescencia como en campo claro.

Los protocolos fueron revisados y ajustados para obtener los mejores resultados; se describen a continuación.

3.1 Marcaje con Fluoizin-3 y Newport Green.

Las células se incubaron en medio base, que contenía 2 μM de Fluoizin-3 (AM, acetoximetil éster, permeable a membranas, F24195, Life Technologies) o con 5 μM de Newport Green, NPG (DCF, diacetato de carboxifluoresceína, permeable a membranas; N7991, Life Technologies) durante 30 minutos en la estufa incubadora de células. Tras lavar las células con medio nuevo, se visualizaron con el microscopio de fluorescencia: Fluoizin-3 (longitud de onda de excitación 494 nm y de emisión 516 nm) y NPG (longitud de onda de excitación 495 nm y de emisión 520 nm).

3.2 Marcaje con TSQ.

Las células se incubaron en medio DMEM base que contenía 152 μM (50 $\mu\text{g/ml}$) de TSQ (N-(6-metoxi-8-quinolil)-p-toluenosulfonamida; M688, Life Technologies) durante 10 minutos en la estufa incubadora de células. Tras lavar las células con medio nuevo, se visualizaron con el microscopio de fluorescencia (longitud de onda de excitación 360 nm y de emisión 420 nm).

3.3 Marcaje con ditizona.

Las células se incubaron en medio DMEM base que contenía 400 μM de ditizona (D5130, Sigma-Aldrich) durante 10 minutos en la estufa incubadora de células. Tras lavar las células con medio nuevo, se visualizaron con el microscopio de campo claro.

3.4 Marcaje con FM1-43.

Las células se incubaron en medio DMEM base que contenía 10 μM de FM1-43 (N-(3-trimetilamonio)propil)-4-(4-(dibutilamino)stirilo)piridinio dibromuro; T35356, Life Technologies) durante 10 minutos en la estufa incubadora de células. Tras lavar las células con

medio nuevo, se visualizaron con el microscopio de fluorescencia (longitud de onda de excitación 510 nm y de emisión 626 nm).

3.5 Permeabilización de membrana para el zinc con el ionóforo piritionato de zinc.

Para realizar algunos controles de evaluación de la captación del fluorocromo del zinc, se incubaron los astrocitos en medio de cultivo sin suero que contenía 50 μ M de piritionato de zinc (H3261, Sigma-Aldrich), en presencia o no de zinc en el medio. Las células se lavaron para eliminar el ionóforo antes del marcaje con los fluorocromos.

4. MARCADORES INDIRECTOS DE ZINC IÓNICO.

Se utilizaron métodos indirectos para detectar el zinc (método de Timm o Neo-Timm de Danscher). No solo la fijación y la precipitación de los iones zinc en sales insolubles son pasos esenciales, ya que es necesario un procesamiento temprano de las muestras para evitar la desaparición de la marca y obtener un resultado en el revelado autometalográfico.

4.1 Precipitación del zinc iónico.

Para poder estudiar el zinc al microscopio electrónico y mediante el método de Neo-Timm (Danscher *et al.*, 1981), es necesario precipitar el zinc iónico que la célula ha captado durante el pulso de zinc. De esta manera el zinc queda inmovilizado para reaccionar tanto con el revelado autometalográfico como con el osmio.

Para precipitar el zinc se utilizaron dos técnicas:

4.1.1 Precipitación con sulfuro sódico.

El proceso de precipitación de zinc iónico con sulfuro sódico se llevó a cabo tras la fijación de las células con PFA 4%, GA 4% y PFA-GA 1%. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con la solución NTS (apartado 2.5.2). Tras la incubación, las células se lavan con abundante agua destilada, quedando preparadas para su posterior tratamiento para autometalografía, tanto con microscopía óptica como microscopía electrónica.

4.1.2 Precipitación con selenito sódico.

El proceso de precipitación de zinc iónico con selenito sódico se llevó a cabo antes de la fijación de las células. Las células fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C con una solución

de 5 mM de selenito sódico (214485, Sigma-Aldrich) en medio DMEM base. Tras la incubación, las células se lavan con DMEM base, quedando preparadas para su fijación con PFA 4%. Posteriormente serían procesadas para microscopía electrónica o para el revelado autometalográfico.

4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión.

Con el objetivo de realizar un estudio ultraestructural de los astrocitos, las monocapas de células fueron procesadas de la siguiente manera:

Una selección de cortes semifinos de 2 μm se reincluyeron y se cortaron nuevamente en secciones ultrafinas. Finalmente se examinaron los cortes en el microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1010.

4.2.1 Inclusión.

Los astrocitos que se destinaron al estudio morfológico, no fueron observados al microscopio de fluorescencia y se procesaron según el protocolo de inclusión en resina Epoxy.

Composición de la resina TAAB:

- 25 ml de resina TAAB (T002, TAAB).
- 25 ml del endurecedor DDSA (D026, TAAB).
- 1 ml del acelerador DMP-30 (D035, TAAB).

Se mezclan la resina y el endurecedor hasta obtener una mezcla homogénea. A continuación se añade el acelerador y se vuelve a remover hasta su perfecta mezcla. La resina puede conservarse congelada hasta su uso.

El protocolo de inclusión de los astrocitos en resina que mejores resultados proporcionó para su estudio morfológico con microscopía electrónica de transmisión fue el siguiente:

- 1- Se fijan las células con paraformaldehído al 4% (PFA) en PB 0,1 M pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.
- 2- Se lavan las células con tampón PB 0,1 M pH 7,4.
- 3- Se incuban las células con sulfuro sódico 0,1% (Na_2S) en GA 3% en tampón PB 0,1 M pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.
- 4- Se lavan las células con agua destilada.
- 5- Se incuban las células con una solución de tetróxido de osmio al 2% en agua destilada (recién disuelto), durante 2 horas en oscuridad a 4°C.
- 6- Se lavan las células con agua destilada.

7- Se deshidratan las células con alcoholes de concentración creciente:

- Etanol 30%, 2x2 minutos a 4°C.
- Etanol 50%, 2x2 minutos a 4°C.
- Etanol 70%, 2x2 minutos a 4°C.
- Etanol 96%, 2x2 minutos a temperatura ambiente.
- Etanol 100%, 2x2 minutos a temperatura ambiente.
- Óxido de propileno, 2x2 minutos a temperatura ambiente.

8- Se incluyen en resina epoxi TAAB:

- Resina-óxido de propileno (1:2, v:v) (P021, TAAB), 10 minutos a temperatura ambiente.
- Resina-óxido de propileno (2:1, v:v), 10 minutos a temperatura ambiente.
- Resina pura, 2x5 minutos a temperatura ambiente.
- Resina pura, a 4°C toda la noche.
- Resina pura, 2x5 minutos a temperatura ambiente.

9- Los cubres con las células se colocan entre 2 láminas de acetato.

10- Se polimeriza la resina en una estufa a 60°C durante 48h.

4.2.2 Microtomía.

4.2.2.1 Secciones semifinas.

Los cubres con los astrocitos, incluidos entre láminas de acetato, se despegan de las láminas de acetato y se observan al microscopio óptico con el fin de localizar el área de mayor interés. Una vez localizada, se le pega encima un bloque de resina con una gota de resina TAAB y se deja polimerizar durante 24h a 60°C. Tras la polimerización, estos bloques se despegan mediante cambios de temperatura con nitrógeno líquido. Los cortes semifinos de 2 µm obtenidos del ultramicrotomo (Reichert-Jung 701701, Leica), pegados a un portaobjetos, se tiñen con azul de toluidina-bórax pH 8,5 (preparado con 0,5 g de azul de toluidina, T3260, Sigma-Aldrich, 1 g de tetraborato sódico, 141644, Panreac y agua destilada hasta 100 ml) durante 1 minuto a 50°C. Posteriormente se lavan con agua destilada.

4.2.2.2 Secciones ultrafinas.

Tras el estudio de los cortes semifinos, estos se pegan con una gota de cianocrilato a un nuevo bloque de resina y tras 2-3 ciclos de cambios de temperatura (de -20° a 50°C), se despega

el semifino. Se procede a la obtención de secciones ultrafinas, de 80 nm de grosor aproximadamente, que se recogen en rejillas de ojal de cobre o níquel recubiertos con una lámina plástica de Formvar (F6146, Sigma-Aldrich).

Los cortes ultrafinos tienen que ser contrastados sumergiéndolos en una solución de citrato de plomo (Solución de Reynolds) durante 20 minutos en oscuridad en un recipiente con unas lentejas de hidróxido sódico para evitar que precipite el plomo sobre las muestras al reaccionar con el CO₂ ambiental.

Solución de citrato de plomo de Reynolds (100 ml):

- 3,52 g de citrato sódico (141655, Panreac).
- 2,66 g de nitrato de plomo (228621, Sigma-Aldrich).
- 16 ml de hidróxido sódico 1 M (141687, Panreac).
- enrasar con agua destilada hasta 100 ml.

4.3 Autometalografía del zinc.

La detección histoquímica del zinc iónico en astrocitos se realizó mediante el método de Neo-Timm (Danscher *et al.*, 1981). El revelado autometalográfico se fundamenta en la adición de plata iónica que es transformada en plata metálica, ésta se hace insoluble y forma cristales sobre los precipitados de zinc-sulfuro, amplificándose de esta manera la señal sobre la marca de zinc y haciéndose visible para su estudio al microscopio óptico.

Los recipientes que vayan a ser utilizados tienen que estar muy limpios, sin restos de metales. Para ello se tratan todos los recipientes con líquido de Farmer, cuya solución se prepara en el momento de ser usada.

Líquido de Farmer (100 ml):

- 90 ml de tiosulfato sódico al 10% en agua destilada (141721, Panreac).
- 10 ml de ferricianuro potásico al 10% en agua destilada (141503, Panreac).

El protocolo consiste en mantener la solución de Farmer en el recipiente hasta que vire de color de verdoso a azul turquesa. A continuación se lavan con abundante agua corriente y finalmente con agua destilada.

La solución reveladora se prepara como se detalla a continuación, en el momento de ser empleada.

Solución reveladora de Danscher Neo-Timm (100 ml):

- 60 ml de Goma arábica al 50% en agua destilada (142061, Panreac).
- 10 ml de Tampón citrato 2 M pH 3,7, preparado con 25,5 g de ácido cítrico 1-hidrato (141018, Panreac) y 23,5 g de citrato tri-sódico 2-hidrato (131655, Panreac) y enrasando con agua destilada hasta 100 ml.
- 15 ml de Hidroquinona 5,7% en agua destilada (822333, Merck).
- 15 ml de Lactato de plata 0,73% pH 3,8 en agua destilada (L7771, Sigma-Aldrich).

La adición de los componentes de la solución tiene que ser por el orden indicado y removiendo con una paleta de madera la solución, para obtener una mezcla homogénea antes de añadir el siguiente componente.

En todos los casos en los que se llevó a cabo un revelado autometalográfico (monocapas, semifinos y ultrafinos), se utilizaron muestras control sin pulso de zinc, con el fin de confirmar que el precipitado autometalográfico era producido por el revelado de zinc y no por la amplificación de otros metales, o por el protocolo de autometalografía. Los controles sin zinc, dieron como resultado una ausencia de precipitado autometalográfico en todos los casos.

4.3.1 Autometalografía del zinc en monocapas.

Para la detección del zinc en monocapas por técnicas autometalográficas utilizamos el siguiente protocolo:

- 1- Fijar las células con PFA 4% en tampón PB pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.
- 2- Lavar con tampón PB 0,1 M pH 7,4.
- 3- Incubación con NTS 0,1% y GA 3% en tampón PB 0,1 M pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.
- 4- Lavar con agua destilada.
- 5- Sumergir las células en la solución autometalográfica a 37°C en oscuridad durante 30 minutos aproximadamente.
- 6- Lavar con abundante agua destilada para detener la reacción de revelado y eliminar completamente la solución de revelado.
- 7- Estabilizar la plata metálica sumergiendo las células en una solución de tiosulfato sódico 10% (p/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8- Lavar las células con abundante agua destilada.
- 9- Montar las preparaciones con algún medio que no disuelva el precipitado formado (por ejemplo, Mowiol 4-88 (17951, Polysciences)).

4.3.2 Autometalografía del zinc en cortes semifinos.

Para la detección del zinc iónico en cortes semifinos por el método de Neo-Timm, se siguieron los siguientes pasos:

- 1- Teñir los cortes semifinos con azul de toluidina.
- 2- Revelar los cortes semifinos con la mezcla autometalográfica durante 45 minutos aproximadamente a 37°C en oscuridad, manteniendo los cortes semifinos en posición vertical.
- 3- Lavar los cortes con abundante agua destilada.
- 4- Estabilizar la plata metálica sumergiendo las células en una solución de tiosulfato sódico 10% (p/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 5- Lavar los cortes con abundante agua destilada.
- 6- Montar los cortes semifinos de forma permanente con Mowiol 4-88.

4.3.3 Autometalografía del zinc en cortes ultrafinos.

Para la detección del zinc iónico en cortes ultrafinos por el método de autometalografía, se siguieron los siguientes pasos:

- 1- Colocar las rejillas de níquel (GG2010-Ni, Electron Microscopy Sciences) con los cortes ultrafinos en posición vertical en un molde de silicona.
- 2- Añadir la solución reveladora al molde de silicona que contiene las rejillas para revelar los cortes ultrafinos en posición vertical.
- 3- Revelar los cortes semifinos a 37°C en oscuridad durante 20 minutos aproximadamente.
- 4- Lavar los cortes con abundante agua destilada.
- 5- Estabilizar la plata metálica en una solución de tiosulfato sódico 10% (p/v) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 6- Lavar las cortes con abundante agua destilada.
- 7- Secar y guardar las rejillas para la observación al microscopio electrónico.

5. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS.

Se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas para comprobar la pureza de los cultivos celulares. Las cuales nos permitieron la identificación de los distintos tipos celulares gracias a la expresión de proteínas específicas (GFAP, MAP-2, NF) mediante fluorescencia en las monocapas de células cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio. También se usaron técnicas inmunocitoquímicas para cuantificar la expresión de la MT-3.

Para llevar a cabo las distintas técnicas inmunohistoquímicas se utilizaron soluciones cuya preparación se detalla a continuación.

Soluciones para inmunocitoquímica:

- Tampón fosfato salino con Triton X-100 0,1% (PBST 0,1%):
 - 100 ml de PBS + 100 µl de Triton X-100.
- Solución de bloqueo de uniones inespecíficas:
 - 5% de suero (NDS ó NGS, correspondiente a la misma especie del anticuerpo secundario) en PBST 0,1%.

El protocolo utilizado se describe a continuación.

Protocolo general de inmunocitoquímica:

- 1- Fijar las células: PFA 4% en PB 0,1 M pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.
- 2- Lavados: PBS 3x10 minutos.
- 3- Permeabilizar membranas: PBST 0,1% durante 10 minutos.
- 4- Incubación con la solución de bloqueo de uniones inespecíficas durante 30'.
- 5- Incubación del anticuerpo primario (ver Tabla 13) diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora en atmósfera húmeda.
- 6- Lavados: PBS 3x10 minutos.
- 7- Incubación del anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo (ver Tabla 14) en solución de bloqueo durante 30 minutos en atmósfera húmeda y oscuridad.
- 8- Lavados: PBS 3x10 minutos en oscuridad.
- 9- Lavados: PB 0,1 M 2x10 minutos en oscuridad.
- 10- Montaje de los cubres sobre portaobjetos con medio de montaje para muestras fluorescentes (S3023, Dako).

Se incluyeron controles de especificidad, omitiendo el anticuerpo primario. Los controles dieron como resultado una ausencia completa de inmunotinción en todos los casos.

Anticuerpo	Características Inmunológicas	Dilución	Referencia	Casa Comercial
ratón anti-GFAP	Monoclonal	1:400	G3893	Sigma-Aldrich
ratón anti-MAP-2	Monoclonal	1:250	M1406	Sigma-Aldrich
conejo anti-NF 200	Policlonal	1:100	N4142	Sigma-Aldrich
conejo anti-MT-3	Policlonal	1:1000	HPA004011	Sigma-Aldrich

Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados para inmunocitoquímica.

Anticuerpo	Marcador	Dilución	Referencia	Casa Comercial
cabra anti-ratón	FITC	1:200	F0257	Sigma-Aldrich
burro anti-conejo	Alexa 555	1:200	A-31572	Life Technologies

Tabla 14. Anticuerpos secundarios utilizados para inmunocitoquímica.

6. EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO.

Se procedió a la extracción de ADN genómico de los ratones Ts65Dn por el método del fenol-cloroformo para determinar cuál era su genotipo mediante PCR cuantitativa (qPCR) (Reinholdt *et al.*, 2011), y así poder separar en el estudio los dos grupos de animales, los controles (euploides) y los trisómicos.

La extracción de ADN se realizó a partir de un fragmento (2-3 mm aprox.) del extremo de la cola del ratón, que se corta en el momento del destete (sobre los 21 días) en el cual también se marcan en las orejas y se estabulan los animales separados por sexos. Los fragmentos de las colas fueron proporcionados por el personal del estabulario y almacenados en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml a -20°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la extracción de ADN genómico se utilizó un tampón de lisis cuya preparación se detalla a continuación.

Tampón de lisis pH 8,0 (100 ml):

- 1,211 g de trizma-base 100 mM (T1503, Sigma-Aldrich).
- Disolver en 80 ml de agua destilada y ajustar a pH 8,0.
- 0,136 g de EDTA 5 mM (ED, Sigma-Aldrich).
- 0,2 g de SDS 0,2% (132363, Panreac).
- 1,168g NaCl 200 mM.
- enrasar con agua destilada hasta 100 ml.

Protocolo de extracción de ADN genómico:

- 1- Se añaden 400 µl de tampón de lisis y 4 µl de proteinasa K (10 mg/ml) (745723, Roche) a cada tubo de microcentrífuga que contiene un fragmento de cola de ratón.
- 2- Se disuelve el tejido incubando las colas a 60°C toda la noche en agitación a 500 rpm (Grant-bio Thermo-shaker PHMT).
- 3- Se centrifugan las muestras a 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos y se transfiere la solución a un tubo de microcentrífuga nuevo, evitando los residuos que quedan en el fondo
- 4- Se añaden 75 µl de Kac 8 M (121479, Panreac) y 500 µl de cloroformo (141252, Panreac), y agitar hasta que se observe turbidez.
- 5- Se congela a -80°C, inmediatamente tras la agitación, durante 30 minutos o más.
- 6- Se descongela y centrifuga a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
- 7- Se recoge el sobrenadante superior evitando el disco formado en la interfase. Se añaden 2 volúmenes de isopropanol, previamente enfriado a -20°C, al sobrenadante (14-650-208, J.T. Baker). Se mueve con cuidado y se comprueba que se forma un precipitado de ADN con un aspecto fibrilar similar a una medusa.
- 8- Se centrifuga a 14.000 rpm a 4°C durante 10 minutos.
- 9- Se elimina el sobrenadante conservando el pellet, se añaden 500 µl de etanol 70% a -20°C y se agita con el vortex.
- 10- Se centrifuga a 14.000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
- 11- Se elimina el etanol sobrenadante, conservando el precipitado de ADN, y se dejar secar al aire durante 2 horas o más.
- 12- Se resuspende el precipitado de ADN con 100 µl de agua destilada.
- 13- Se conserva en el congelador a -20°C.

Una vez obtenido el ADN genómico de cada individuo, se determinó el genotipo de los animales mediante PCR cuantitativa analizando 2 genes: el *APP* que tendría 3 copias y el *ApoB* que tendría 2 copias, tal y como se ha descrito anteriormente por Liu *et al.* (2003), utilizando los siguientes cebadores diseñados para amplificar los genes diana (Integrated DNA technologies):

<i>APP</i> F directo	5' - TGT TCG GCT GTG TGA TCC TGT GAC -3'	(24 pb)
<i>APP</i> R inverso	5' - AGA AAC GAG CGG CGA AGG GC -3'	(20 pb)
<i>ApoB</i> F directo	5' - TGC CAG GCT TGT GCT GCT GT -3'	(20 pb)
<i>ApoB</i> R inverso	5' - GGG TGC TGC CTT TCT CTT GGG -3'	(21 pb)

El proceso de genotipado se llevó a cabo utilizando EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne), mezcla que contiene todos los elementos necesarios para la qPCR: la enzima ADN polimerasa, los dNTPs, el agente intercalante fluorescente y el tampón para la reacción.

En una placa de 96 pocillos se cargaron los siguientes volúmenes:

Reactivo/pocillo	Vol.	Reactivo/placa	Vol.
Eva Green	4 µl	Eva Green	200 µl
Agua destilada	11 µl	Agua destilada	550 µl
Cebador	1 µl	Cebador	50 µl
ADN	4 µl	ADN	200 µl
Total	20 µl	Total	1000 µl

La reacción de amplificación en cadena de la polimerasa se realizó en el termociclador ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) utilizando el programa Step One Plus Real-Time PCR System con los parámetros que se detallan a continuación:

Etapas del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de la polimerasa	95°C	15 min	1
Desnaturalización	95°C	15 s	40
Alineamiento	60°C	20 s	
Elongación	72°C	20 s	

Y la cantidad relativa de los genes diana en las muestras fue cuantificada por el método de la comparación de C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) (*Threshold Cycle*). El fluorocromo Eva Green genera una señal de fluorescencia cuando se une a una doble cadena de ADN genómico y es proporcional a la cantidad de producto, esta señal se recoge y verifica mediante la *Melt Curve* (curva de disociación) para realizar un análisis de curva de disociación de los genes diana amplificados. Una vez obtenidos los valores brutos, estos se analizan estableciendo los valores de umbral de detección de fluorescencia (ΔR_n) en torno a 0,1 de emisión de fluorescencia, donde la gráfica de amplificación en escala logarítmica está en fase lineal, obteniendo así el valor del ciclo umbral (C_T) para cada una de las muestras.

Para determinar si las muestras pertenecían a animales disómicos o trisómicos, se compararon los valores de C_T con la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$. De forma que al dividir los valores C_T de los genes diana entre dos obtenemos valores cercanos a 1 pertenecientes a animales disómicos (gen ApoB en disomía) y valores próximos a 1,5 pertenecientes a animales

trisómicos (gen APP en trisomía). También fueron analizados en la misma placa, juntos con el resto de muestras, muestras de ADN de animales de genotipo conocido, que se usaron como control, para cada uno de los genotipos.

7. SILENCIAMIENTO GÉNICO CON shARN.

Para realizar el ensayo de silenciamiento de la proteína MT-3 mediante la transfección de shARN (horquilla corta de ARN), se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de ratón y se prepararon como se ha descrito anteriormente (apartado 2.1), sembrándose sobre una placa de cultivo de seis pocillos. Las células crecieron hasta una confluencia del 70% en un medio de crecimiento normal suplementado con un 5% de SBF.

Se utilizaron dos plásmidos de ADN que contenían el shARN, uno con la secuencia de inhibición para la proteína MT-3 y otro plásmido utilizado como control para comprobar que el shMT-3 no influía en el proceso y cuya secuencia de ARN no está dirigida contra ningún ARN mensajero conocido de mamífero. Ambos plásmidos codificados en el shARN se introducen en las células mediante transfección de base lipídica.

Los plásmidos de shARN para silenciar el MT-3 están formados por un conjunto de cinco vectores plasmídicos lentivirales, cada uno de los cuales codifica para un shARN específico de 19-25 nucleótidos con un bucle de 6 pares de bases. La transcripción de shARN está regulada mediante el promotor H1. Tras la transfección, las células que expresan shARN de forma estable pueden seleccionarse mediante el uso del antibiótico puromicina, ya que contiene el gen de resistencia a puromicina que codifica la enzima N-acetiltransferasa.

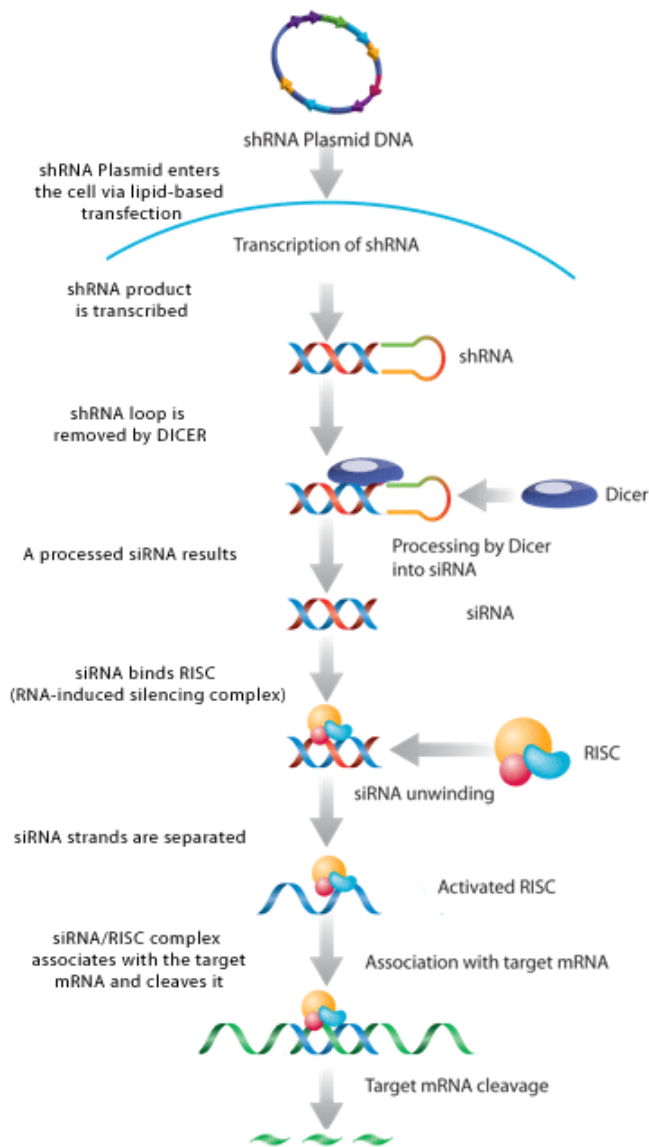


Figura 22. Esquema del proceso de silenciamiento génico con shARN.

En el proceso de silenciamiento génico del gen diana MT-3, se introduce el plásmido con el constructo en las células, este se transcribe y procesa hasta obtener el siARN, que formará el complejo de silenciamiento encargado de degradar total o parcialmente el ARNm inhibiendo su función (Santa Cruz Biotechnology).

El primer grupo de pocillos se transfectó con un plásmido control (sc-108065, Santa Cruz Biotechnology), el segundo grupo de pocillos se transfectó con un plásmido que contenía el shMT-3 (sc-93438-SH, Santa Cruz Biotechnology) y el tercer grupo de pocillos no fue transfectado. Se prepararon las siguientes soluciones para cada transfección:

Soluciones de transfección (100 µl):

- Solución A, solución del plásmido de ADN:
 - 10 µl del plásmido shARN (1 µg del plásmido shARN control o MT-3).
 - 90 µl del medio de transfección del plásmido shARN (sc-108062, Santa Cruz Biotechnology).
- Solución B, solución de transfección del plásmido:
 - 4 µl del reactivo de transfección del plásmido shARN (sc-108061, Santa Cruz Biotechnology).
 - 96 µl de medio de transfección del plásmido shARN.
- Medio de selección:
 - 1 µg/ml de puomicina (sc-108071, Santa Cruz Biotechnology) en medio DMEM completo.

La solución del plásmido shARN (Solución A) se añadió directamente a la solución que contiene el reactivo de transfección del plásmido shARN (Solución B) (Liang *et al.*, 2010). Se mezclaron ambas soluciones pipeteando suavemente, y la mezcla se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente antes de la transfección.

A continuación, se lavaron las células dos veces con 2 ml de medio de transfección del plásmido shARN por pocillo. Tras eliminar el medio, se añadieron 0,8 ml de medio de transfección del plásmido shARN a cada pocillo y luego se añadieron 200 µl del complejo (Solución A+B) plásmido de shARN/reactivo de transfección del plásmido a cada pocillo, cubriendo toda la superficie. Posteriormente, el medio se mezcló agitando suavemente la placa para asegurarse de que toda la monocapa de células estaba bañada por la solución. Las células se incubaron durante 7 horas en un incubador con una atmósfera húmeda, un 5% de CO₂ y 95% de aire, a 37°C. Tras de la incubación, se añadió 1 ml de medio DMEM completo con el doble de suero y de antibiótico al medio y las células se incubaron en estas condiciones durante 24 horas.

Las células transfectadas se seleccionaron usando un medio de selección que contenía el antibiótico puomicina. Las células se mantuvieron en este medio durante 4 días (con cambios de medio cada dos días), usando las células para los experimentos a partir de este momento.

8. CAPTURA, PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES.

Todas las imágenes de campo claro y fluorescencia fueron capturadas y analizadas con un microscopio Olympus BX50WI. Se tomaron imágenes de cada experimento en idénticas condiciones, para permitir una mejor comparación de los resultados del experimento. Las imágenes de las monocapas de células de cada tratamiento fueron tomadas al azar. Para estudios de intensidad de fluorescencia, a los valores obtenidos, se les restó los valores de la fluorescencia de fondo, obtenida mediante mediciones de las áreas vacías (sin células) de cada imagen. Los recuentos de partículas se realizaron en todas las células presentes y con imágenes tomadas aleatoriamente a gran aumento (60x). Los resultados se expresaron en forma de partículas/superficie celular. Las imágenes de fluorescencia de la monocapa y de la superficie celular se obtuvieron simultáneamente junto con imágenes de campo claro (iluminación con contraste interferencial). Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia también se utilizó el software Image J (NIH) y los resultados se expresaron como porcentaje del control en condiciones basales.

Las imágenes de las monocapas tras el revelado autometalográfico, se realizaron con un microscopio Zeiss Axioplan. En cada experimento se realizaron capturas de imágenes a 40 aumentos en campo claro y en campo oscuro, en idénticas condiciones para todas las muestras.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y OTROS PROCEDIMIENTOS.

Para cada experimento se tomaron varias fotos de cada grupo o tratamiento, a partir de las cuales se realizaron las respectivas mediciones de las células para obtener las medias, desviaciones típicas y realizar los cálculos estadísticos. La n indica el número de células analizadas y se especifica en el pie de figura de cada gráfica. Los valores representados son el promedio de varios experimentos análogos para la comparación entre los diferentes grupos. Los resultados numéricos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM) o como el porcentaje del control en condiciones basales. Las diferencias estadísticamente significativas eran aceptadas cuando obteníamos valores de $p < 0,05$ utilizando la prueba t de Student para determinar las diferencias entre dos medias muestrales y la prueba ANOVA para determinar las diferencias entre varias medias muestrales. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS v19.0 (SPSS, Chicago, IL).

Se utilizó el Microsoft Office Word 2013 (Microsoft Corporation) como procesador de texto. El software utilizado para el procesamiento de las imágenes fue, Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics), ImageJ 1.44 (National Institute of Health) y Corel Photo-Paint X3 (Corel Corporation).

10. PRODUCTOS Y EQUIPOS.

Los productos químicos fueron adquiridos a proveedores habituales de reactivos, los más específicos se indican en cada protocolo.

Los equipos utilizados para la captura de imágenes de las monocapas tras el revelado autometalográfico fueron un microscopio Zeiss Axioplan equipado con una cámara digital Olympus DP70. Para los estudios con fluorescencia se utilizó un microscopio Olympus BX50WI equipado con una cámara digital de alta sensibilidad Hamamatsu ORCA C7780-20, un controlador de obturación Uniblitz y un filtro de rueda Sutter Lambda 10-2, controlado todo con el software Aquacosmos 2.6 (Hamamatsu Photonics). Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010 equipado con una cámara digital Megaview III y controlado con el software Analysis 3.0 (Soft Imaging System).

También se utilizaron: micropipetas automáticas de volumen regulable, balanzas de precisión, autoclaves, agitadores, microondas, destiladores, sonicadores, pHmetros, estufas, lupas, arcones congeladores de -20°C para muestras y reactivos, rejillas de cobre y níquel, un ultramicrotomo Reichert-Jung 701701 (Leica), material de vidrio usual en todo el laboratorio, material de plástico estéril desechable, material quirúrgico, etc.

IV. RESULTADOS

1. DETECCIÓN DEL ZINC CON FLUORESCENCIA.

Para llevar a cabo el estudio de la captación del zinc en astrocitos en cultivo, se decidió utilizar la técnica de microscopía de fluorescencia, por su elevada especificidad y porque posibilita la visualización de las células *in vivo* mientras vamos aplicando los distintos tratamientos e incubaciones. Para ello se testaron tres fluorocromos específicos para el zinc de la gran variedad que existen, como son el TSQ, el FluoZin-3 AM y el Newport Green DCF (Frederickson *et al.*, 1987; Gee *et al.*, 2002; Sensi *et al.*, 1999). El estudio se completó con ensayos realizados con distintas concentraciones y tiempos de pulso de zinc.

1.1 Selección del fluorocromo para estudiar la captación de zinc en astrocitos.

Se llevaron a cabo distintos ensayos para determinar qué marcador era el apropiado para el estudio de la captación de zinc. Para ello se ensayaron los marcadores TSQ, Newport Green DCF y FluoZin-3 AM en cultivos de astrocitos. Las células fueron primeramente incubadas con TPEN (agente quelante de zinc) durante 20 minutos, y posteriormente con el Newport Green DCF durante 30 minutos, permitiendo así que las esterasas citoplasmáticas pudieran hidrolizar y activar el fluorocromo. En el caso del TSQ el tiempo de incubación fue de 10 minutos porque no necesitaba la actividad de las esterasas.

A continuación, el medio de cultivo fue reemplazado por medio nuevo y las células fueron fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (figura 23A), utilizando las longitudes de onda de excitación y emisión correspondientes para cada fluorocromo (tabla 15). Esta imagen representa la fluorescencia de las células sin zinc.

Fluorocromo	λ_{ex}	λ_{em}	$K_d \text{ Zn}^{2+}$
TSQ	360 nm	420 nm	0,01-10 μM
Newport Green DCF	495 nm	520 nm	1 μM
FluoZin-3 AM	494 nm	516 nm	15 nM

Tabla 15. Longitudes de onda y constantes de disociación de los fluorocromos para el zinc.

Inmediatamente después, para obtener una imagen de las células cargadas con zinc, las células se incubaron con 50 μM ZnSO_4 durante 10 minutos y fueron nuevamente fotografiadas. Los resultados no mostraron cambios apreciables a simple vista con el fluorocromo Newport Green DCF, solamente se detectó una débil marca fluorescente, con la que la morfología celular no pudo ser observada claramente (figura 23B).

Con el objetivo de comprobar que las células habían captado el fluorocromo y el zinc, a pesar de la baja fluorescencia obtenida, las células se incubaron con 50 μM de piritionato de zinc (ionóforo específico para el zinc) en presencia de 50 μM ZnSO_4 (figura 23C). Aquí, se observó claramente un aumento significativo en la fluorescencia celular, lo que significaba que prácticamente no había zinc detectable en el citosol hasta que no fue añadido el ionóforo específico para el zinc, permitiendo así su entrada y la unión con el fluorocromo.

Esta imagen era bastante diferente del marcaje de los astrocitos tras ser incubados con TPEN, el pulso de zinc extracelular y marcado con TSQ (figura 23G), así pues, tras cambiar el medio de cultivo, se añadió TSQ a las mismas células (figura 23E). En ese momento, las células se volvieron más fluorescentes y aparecieron muchos orgánulos/partículas brillantes (zincosomas, Haase and Beyersmann, 1999) por todo el citosol, lo que significa que esos zincosomas llenos de zinc estaban presentes en el citosol, pero no se marcaron hasta que no se les añadió el marcador TSQ. Hay que destacar que tras la incubación con TSQ, los astrocitos mostraron una disminución brusca de los valores de fluorescencia del NPG (figura 23D), lo que significa que el TSQ tiene mayor afinidad por el zinc que el NPG. Finalmente, las células fueron incubadas con TPEN y se observó una disminución de la fluorescencia, similares a los valores iniciales (figura 23F).

Para cuantificar estas observaciones, se midieron los niveles de fluorescencia de cada uno de los distintos tratamientos (figura 24), y tras lo cual, podemos apreciar un nivel de fluorescencia muy bajo correspondiente al zinc basal. Tras el pulso de zinc exógeno, se produce un aumento significativo de los niveles de fluorescencia, aunque no fueron apreciables a simple vista (t de Student, $p < 0,001$). Tras añadir el ionóforo vemos un gran aumento en los valores de fluorescencia (300%) (t de Student, $p < 0,001$). Posteriormente, tras añadir el marcador TSQ y el quelante de zinc, vemos una reducción de la misma magnitud (t de Student, $p < 0,001$).

Por lo que deducimos que el marcador Newport Green DCF no es apropiado para el estudio de la captación de zinc extracelular en cultivos de astrocitos, ya que no marca zincosomas que permitan su estudio tras el pulso de zinc exógeno. Mientras que el marcador TSQ, sí que ofrece un marcaje fluorescente en forma de zincosomas por todo el citosol que permite su cuantificación y análisis.

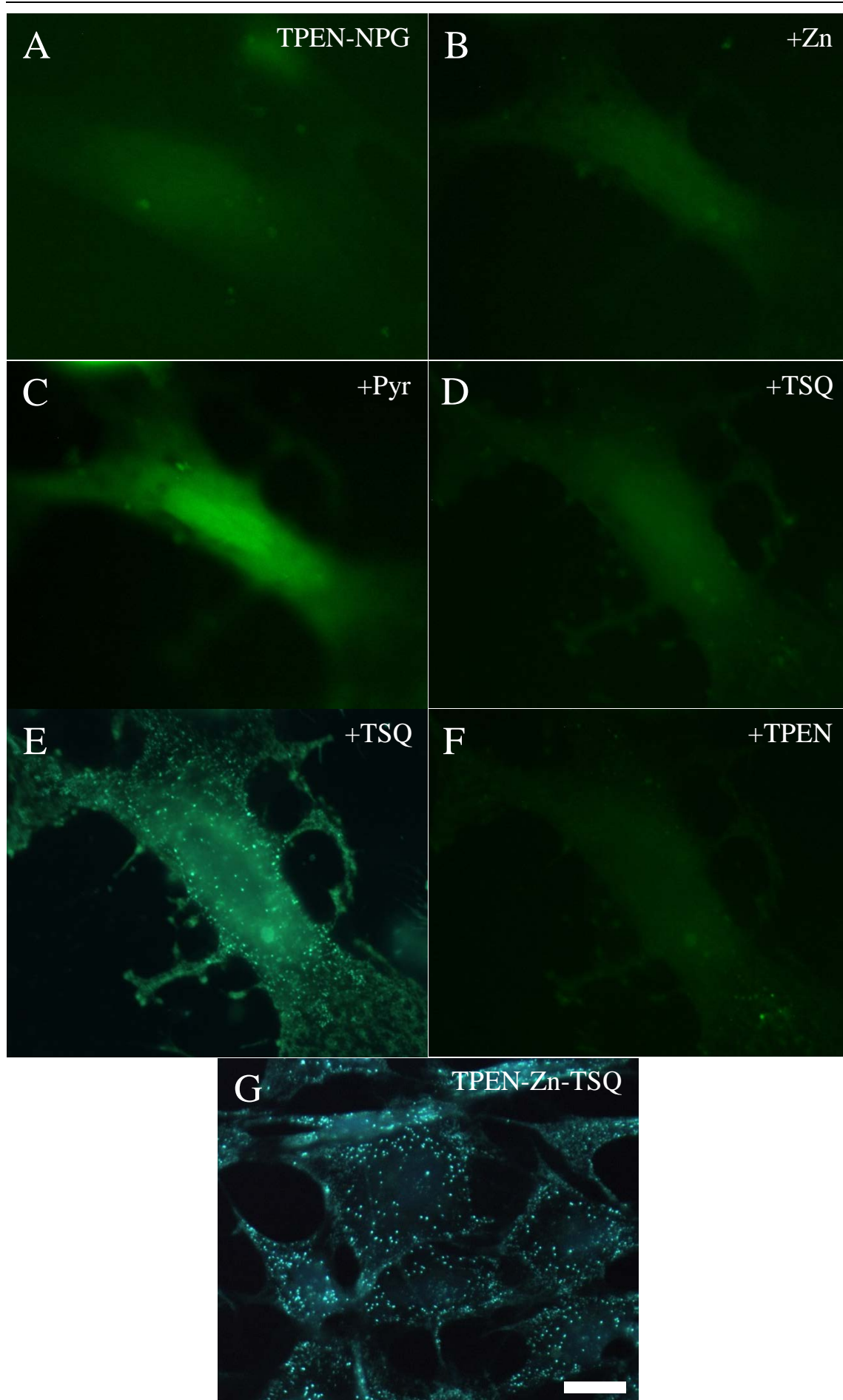
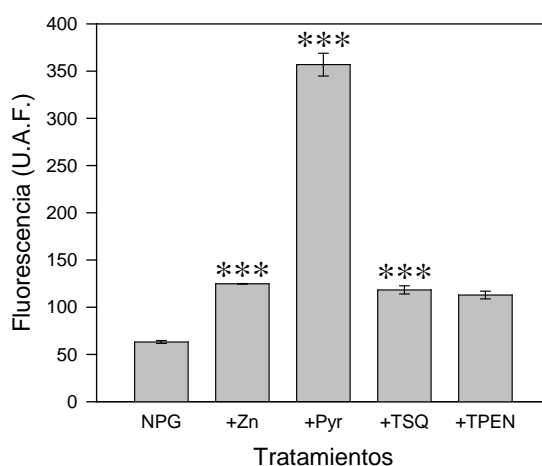


Figura 23. Uso de diferentes fluorocromos para la detección de zinc en astrocitos (I).

Imágenes representativas de astrocitos incubados con TPEN y seguido del marcador Newport Green DCF (NPG). La fluorescencia obtenida era muy baja y la morfología celular no podía ser detectada correctamente (A). Tras la incubación con 50 μM ZnSO_4 , el análisis de la fluorescencia celular no mostró cambios significativos (B). Las células se incubaron con el ionóforo piritionato de zinc, dando como resultado un aumento homogéneo y significativo en la fluorescencia celular (C). A continuación, se añadió TSQ a las mismas células, provocando tanto una reducción del marcaje citoplásmico de la fluorescencia del NPG (D), como la aparición de zincosomas con las condiciones de visualización del TSQ (E). Finalmente, se añadió TPEN al cultivo, produciendo la quelación de zinc (F), con niveles de fluorescencia similares a las condiciones iniciales. En (G) se muestran astrocitos marcados con TSQ tras la incubación con TPEN y un pulso de zinc, mostrando un marcaje puntiforme. Escala: 20 μm .

**Figura 24. Uso de diferentes fluorocromos para la detección de zinc en astrocitos (II).**

Gráfica mostrando los niveles de fluorescencia cuantificados a 520 nm (λ_{em} del NPG) tras los distintos tratamientos. Con el NPG vemos que los niveles de zinc basal son muy bajos, y éstos aumentan al añadirles el pulso de zinc exógeno a los astrocitos. Pero es al añadir el ionóforo piritionato de zinc cuando las células muestran los mayores niveles de fluorescencia. Posteriormente, se añade el marcador TSQ, y los valores de fluorescencia citoplásmica se ven reducidos, a la vez que se marcan los zincosomas. Finalmente, con la adición del quelante de zinc TPEN, vemos como los valores de fluorescencia citoplásmica no varían. Nota: los asteriscos indican diferencias significativas sobre la columna de su izquierda (*t* de Student, *** $p < 0,001$, $n = 20$ células).

A continuación, se procedió a comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos en el apartado anterior. Para ello se utilizó otro modelo celular para estudiar el comportamiento de la captura de zinc exógeno. Se utilizó el marcador FluoZin-3 tanto en cultivo de astrocitos como de neuronas. Las células fueron primeramente incubadas con TPEN durante 20 minutos, y luego con el marcador FluoZin-3 durante 30 minutos, permitiendo a las esterasas citoplasmáticas hidrolizar el fluorocromo. A continuación, las células se incubaron con un pulso de 50 μM ZnSO_4 durante 10 minutos. Tras cambiar el medio de cultivo por medio nuevo, las células fueron fotografiadas con un microscopio de fluorescencia (figura 25C-D) y con contraste de fases (figura 25A-B). Pudimos observar la marca de fluorescencia del FluoZin-3 en las neuronas (figura 25C), mientras

que los astrocitos no mostraron ninguna tipo de marca (figura 25D). Por lo que deducimos que el marcador FluoZin-3 no es apropiado para el estudio de la captación de zinc en cultivos de astrocitos, ya que no genera ninguna marca fluorescente en forma de zincosomas que permitan su estudio y cuantificación. Por contra, el FluoZin-3 si es un marcador apropiado para el estudio del zinc capturado en cultivo de neuronas, ya que proporciona un claro marcaje fluorescente del zinc citoplasmático, aunque no de zincosomas.

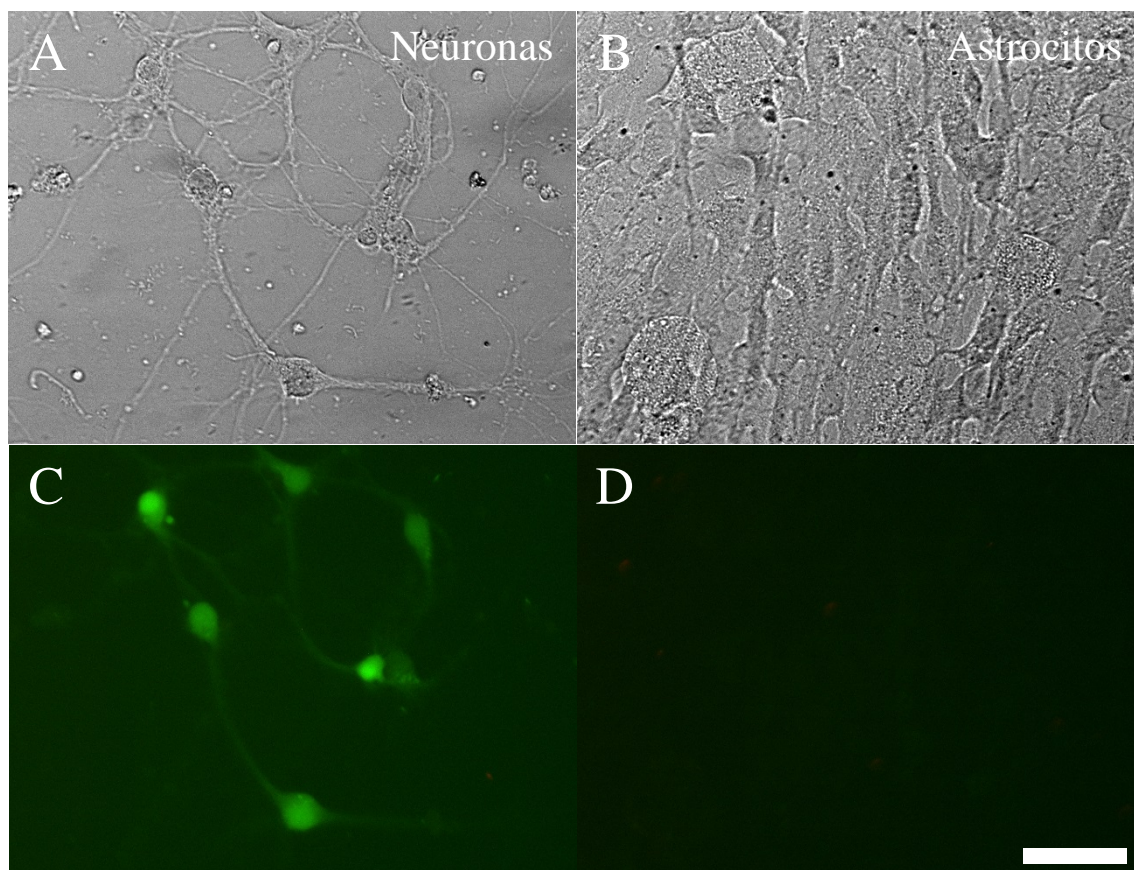


Figura 25. Captación de zinc en neuronas y astrocitos en cultivo marcadas con FluoZin-3.

Imagen representativa mostrando cultivos de neuronas (A) y de astrocitos (B) que fueron incubados con el marcador FluoZin-3 y luego se les dio un pulso de zinc exógeno. El resultado fue un marcaje fluorescente principalmente citoplasmático en el soma de las neuronas (C), mientras que los astrocitos no mostraron ningún tipo de marcaje (D). Escala: 40 μ m.

1.2 Formación de zincosomas con pulso de zinc exógeno.

Para estudiar el proceso de marcaje de los zincosomas, se utilizaron cultivos de astrocitos en monocapa. Éstos se incubaron previamente con TPEN, y a continuación, a unas monocapas se les dio un pulso de zinc exógeno, mientras que otras se incubaron solo con medio nuevo, utilizándose de control. Finalmente, las células se marcaron con TSQ y se tomaron fotos a 60 aumentos para estudiar el marcaje con fluorescencia.

Como se puede ver en la figura 26A, solo los astrocitos en cultivo que habían sido incubados con el pulso de zinc exógeno, presentaron zincosomas fluorescentes marcados con el TSQ. Mientras que los astrocitos sin el pulso de zinc exógeno (figura 26B), no mostraron ningún tipo de marca. Por lo que deducimos que las células poseen muy poco zinc detectable con TSQ antes del pulso de zinc exógeno (figura 26B), así, los zincosomas brillantes que vemos repartidos por todo el citosol (figura 26A) son de nueva generación tras recibir el pulso de zinc.

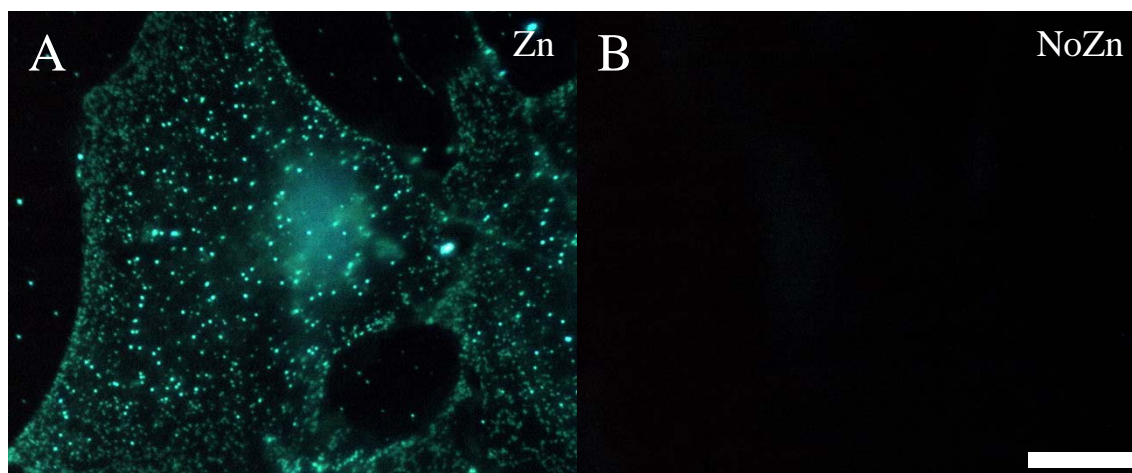


Figura 26. Formación de zincosomas con pulso de zinc exógeno.

Imagen representativa mostrando las diferencias entre los cultivos de astrocitos incubados con o sin un pulso de zinc exógeno, que han sido previamente incubadas con TPEN para eliminar el zinc libre y marcado este zinc exógeno posteriormente con TSQ. En (A) los astrocitos se incubaron con 50 μM ZnSO_4 durante 10 minutos y en (B) solo con medio nuevo. Al incubar las células con el marcador TSQ, observamos cómo solo las células que habían recibido el pulso de zinc exógeno mostraban zincosomas brillantes (A), mientras que las células sin el pulso de zinc, no mostraron ningún tipo de marca (B). Escala: 20 μm .

1.3 Efecto del tiempo de incubación con TSQ en la formación de zincosomas.

Con el objetivo de determinar cuál era el tiempo mínimo necesario de incubación con TSQ para obtener un correcto marcaje del zinc que nos permitiera cuantificar, tanto la densidad, como el tamaño e intensidad de fluorescencia de los zincosomas con los distintos tratamientos, se ensayaron distintos tiempos de incubación con el fluorocromo TSQ, entre 1 y 10 minutos tras el pulso de zinc. Estos ensayos de incubación con TSQ se realizaron tanto con incubación con TPEN previo, como sin TPEN, para determinar si la incubación con el quelante tenía algún efecto sobre la captación zinc y la formación de zincosomas.

Observamos que, con la incubación de 1 minuto con TSQ no obteníamos una marca fluorescente que nos permitiera ver la morfología de las células correctamente (figura 27A-B). Aunque a los 5 minutos de incubación con TSQ ya podíamos ver células con zincosomas marcados (figura 27C-D), solo tras 10 minutos de incubación con TSQ obteníamos unos zincosomas marcados bien definidos y distribuidos por todo el citosol (figura 27E-F).

Tras la cuantificación de los valores de fluorescencia (figura 28), vimos que las células mostraban una densidad de zincosomas similares entre las incubaciones con y sin TPEN (figura 28A). Encontramos diferencias significativas en cuanto al tamaño de los zincosomas, sin la incubación con TPEN a los 5 minutos con TSQ, las células mostraban zincosomas un 75% más grandes que las células que habían sido incubadas durante 5 minutos con TSQ y previamente con TPEN (t de Student, $p < 0,001$), y con 10 minutos de incubación con TSQ, sin TPEN los zincosomas también mostraron un tamaño un 25% mayor que los astrocitos incubados previamente con TPEN (t de Student, $p < 0,001$) (figura 28B). Respecto a los valores de fluorescencia, solo encontramos diferencias significativas a los 5 minutos de incubación con TSQ, siendo un 23% mayor sin TPEN que las células que habían sido incubadas con TPEN (t de Student, $p < 0,001$) (figura 28C).

Por lo que podemos deducir que, al eliminar gran parte del zinc celular con el quelante TPEN, tras el pulso de zinc, marcamos los zincosomas de nueva formación (de menor tamaño), mientras que sin la incubación con el quelante TPEN, tras el pulso de zinc exógeno, estamos marcando con TSQ zincosomas de nueva formación y los ya presentes en las células (de mayor tamaño). Estos resultados apoyan a los resultados obtenidos en el apartado 1.1 (figura 23).

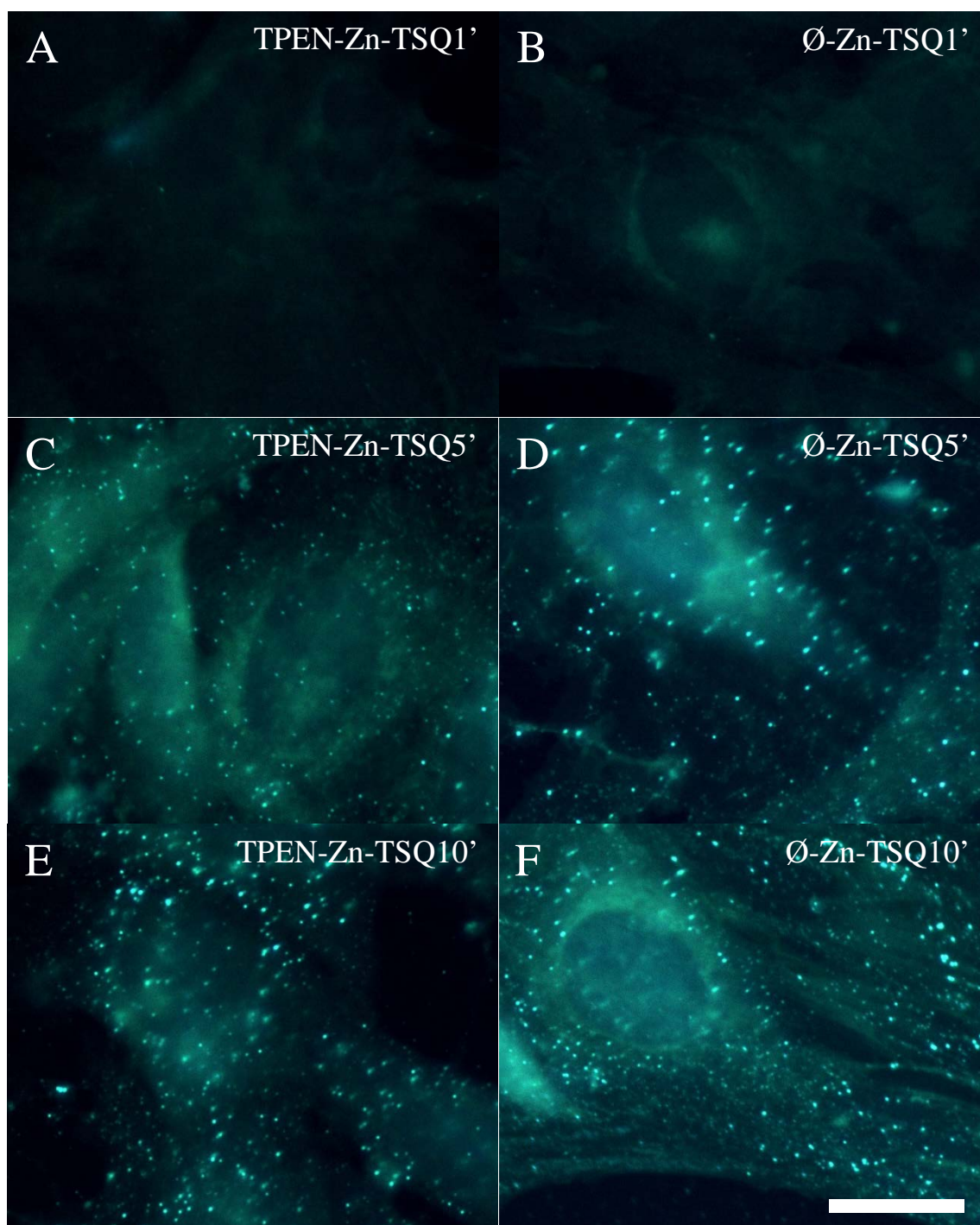


Figura 27. Distintos tiempos de incubación con el fluorocromo TSQ (I).

Imagen representativa de astrocitos incubados con un pulso de zinc exógeno y posteriormente marcados con el fluorocromo TSQ durante distintos tiempos de incubación. Podemos observar como con solo 1 minuto de incubación con TSQ, las células no mostraron zincosomas (A-B), solamente una pequeña marca difusa en el citosol. Con 5 minutos de incubación con TSQ (C-D) ya podemos ver unos pocos zincosomas brillantes en el citosol. Y con 10 minutos de TSQ (E-F) observamos un aumento en la densidad y el tamaño de los zincosomas, apreciándose de forma más nítida los zincosomas, facilitando así su cuantificación. Obsérvese que con TPEN (C, E), los zincosomas son mayoritariamente pequeños, y sin TPEN (D, F) el tamaño es más heterogéneo, abundando los zincosomas grandes, especialmente a tiempos cortos. Escala: 20 μm .

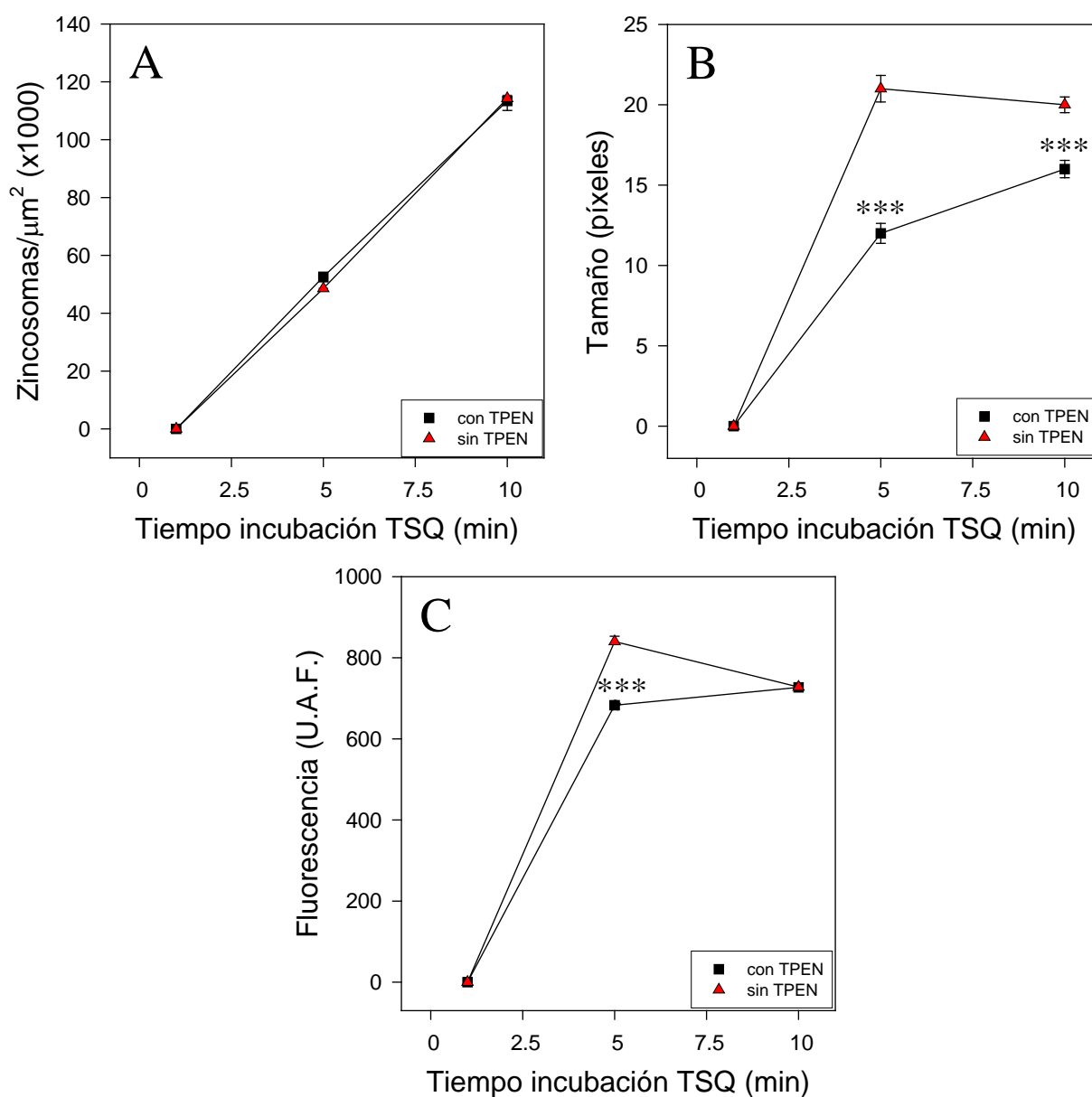


Figura 28. Distintos tiempos de incubación con el fluorocromo TSQ (II).

Gráfica mostrando el aumento en la densidad de zincosomas detectados proporcionalmente al tiempo de incubación con TSQ en (A). En (B) se relaciona el tamaño de los zincosomas con el tiempo de incubación con TSQ, observándose zincosomas más grandes sin TPEN tanto en 5 como en 10 minutos de incubación. En (C) comprobamos como la fluorescencia de los zincosomas es similar tanto con TPEN como sin TPEN y que aumenta rápidamente hasta 5 minutos de incubación y luego se estabiliza. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student, *** $p < 0,001$, $n = 74$ células).

1.4 Efecto del tiempo del pulso de zinc en la formación de zincosomas.

Para comprobar si el tiempo del pulso de zinc afectaba a la formación de zincosomas, se hicieron ensayos de captación de zinc con distintos tiempos de incubación. Primeramente, los astrocitos se incubaron con TPEN y a continuación se realizaron incubaciones con zinc exógeno a distintos tiempos, desde 10 segundos hasta 10 minutos. Tras el pulso, las células se marcaron con TSQ durante 10 minutos y se fotografiaron con fluorescencia a 60 aumentos.

Observamos cómo, las células incubadas con zinc exógeno a diferentes tiempos presentaban un aumento en la densidad de zincosomas conforme aumentaba al tiempo del pulso de zinc. Y lo mismo sucedía con el tamaño de los zincosomas (figura 29B-E). Tanto la densidad como el tamaño de los zincosomas presentaban un aumento creciente conforme aumenten los primeros segundos de incubación (figura 29B-C), siguiendo aumentando con el tiempo de incubación. En el caso del control sin zinc, no se formaron zincosomas.

Tras la cuantificación de los valores de fluorescencia (figura 30), vimos que las células mostraban un mayor aumento en la densidad de zincosomas con los tiempos más cortos (figura 30A). El tamaño de los zincosomas también aumentó de forma similar a la densidad de zincosomas, siendo muy rápido el incremento en el tamaño con los tiempos cortos (figura 30B). Finalmente, vemos como los valores de fluorescencia de los zincosomas se mantienen constantes en todos los tiempos de incubación con zinc (figura 30C).

Por lo que podemos deducir que, durante la incubación con zinc exógeno, las células van capturando el zinc del espacio extracelular y lo almacenan formando zincosomas, que aumentan en densidad y tamaño conforme aumenta el tiempo del pulso de zinc exógeno.

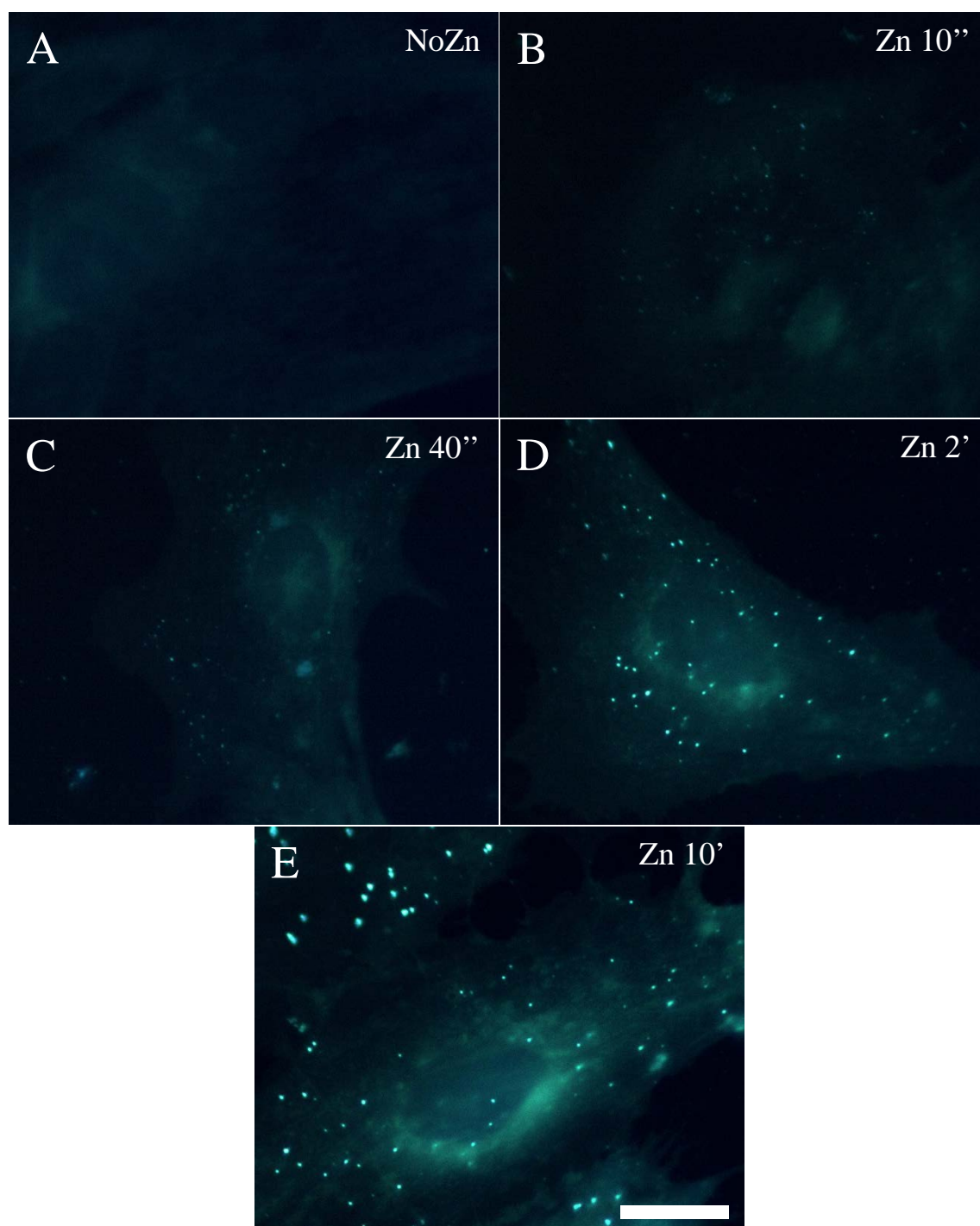


Figura 29. Formación de zincosomas con diferentes tiempos de incubación con zinc (I).

Imagen representativa de astrocitos incubados con un pulso de zinc exógeno de distinta duración y posteriormente marcados con el fluorocromo TSQ. Podemos observar, cómo sin zinc las células no muestran zincosomas (A), solamente una pequeña marca difusa en el citosol. Con tiempos cortos (10 y 40 segundos) ya se aprecian pequeños zincosomas en el citosol (B y C respectivamente) y con tiempos más largos, éstos van aumentando en densidad y tamaño (D y E respectivamente). Escala: 20 μm .

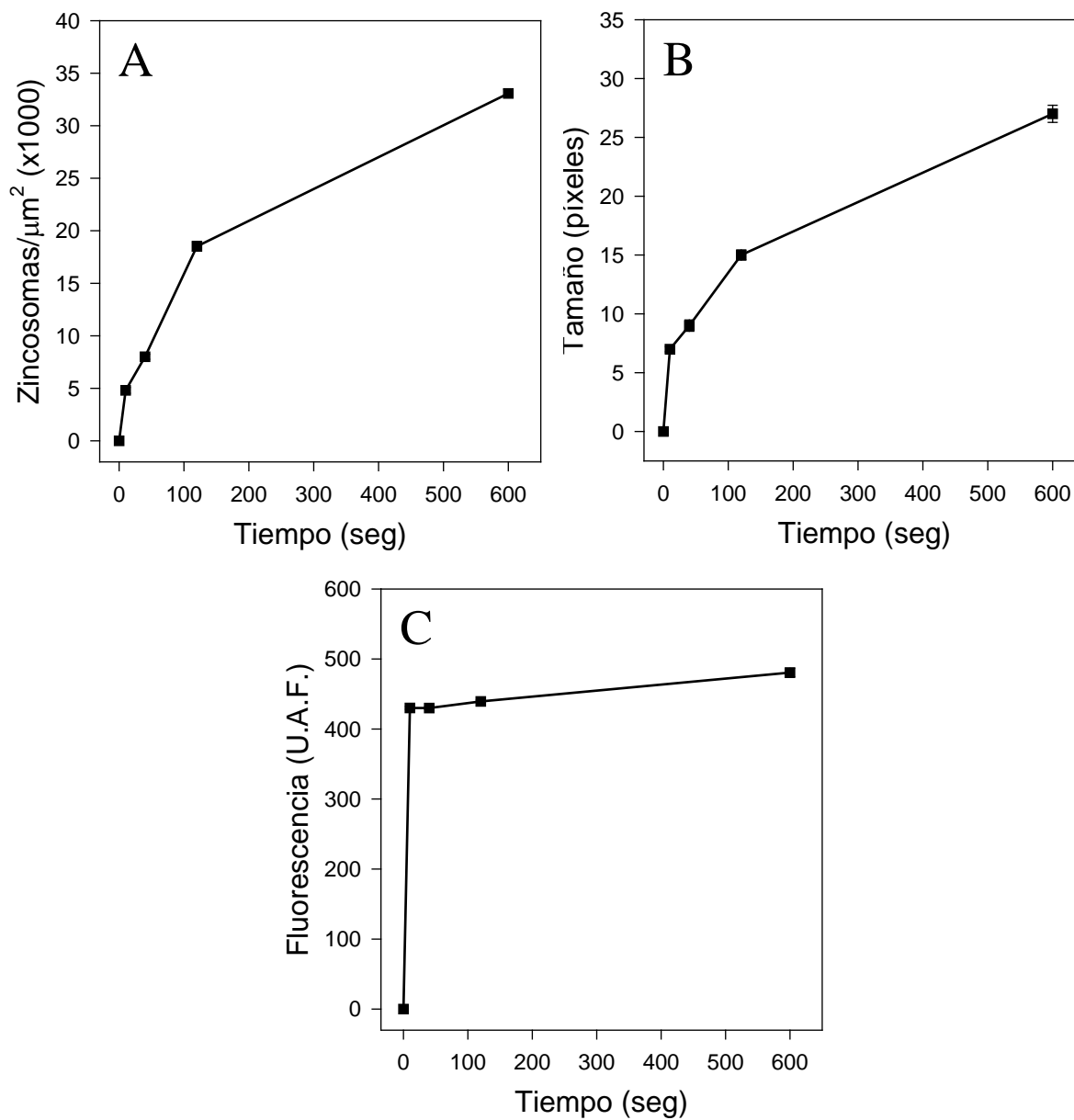


Figura 30. Formación de zincosomas con diferentes tiempos de incubación con zinc (II).

Gráfica mostrando el aumento de la densidad de zincosomas con respecto a la duración del pulso de zinc en (A). En (B) se relaciona el tamaño de los zincosomas con el tiempo de incubación de los astrocitos con el pulso de zinc exógeno, observándose un mayor aumento a tiempos cortos que a tiempos largos. En (C), los niveles de fluorescencia de los zincosomas se mantienen constante independientemente del tiempo de exposición (n = 87 células).

1.5 Efecto de la concentración de zinc en la formación de zincosomas.

Para comprobar si la concentración de zinc afectaba a la formación de zincosomas, se hicieron ensayos en los que las células se incubaron con distintas concentraciones de zinc. Primeramente, los astrocitos se incubaron con TPEN y a continuación se realizaron incubaciones con zinc exógeno a distintas concentraciones fisiológicas, entre 25 y 200 μM ZnSO_4 durante 10 minutos (Dineley *et al.*, 2000). Tras el pulso, las células se marcaron con TSQ durante 10 minutos y se tomaron fotos con fluorescencia a 60 aumentos.

Observamos cómo, los astrocitos incubados con zinc exógeno a distintas concentraciones presentaban un aumento en la densidad de zincosomas a medida que aumentaba la concentración del pulso de zinc. Y lo mismo sucedía con el tamaño de los zincosomas (figura 31B-E). En el caso del control sin zinc, no se formaron zincosomas.

Tras la cuantificación de los valores de fluorescencia (figura 32), vimos que las células mostraban un aumento proporcional y continuo en la densidad de zincosomas con el incremento en la concentración de zinc (figura 32A). El tamaño de los zincosomas presentó un aumento progresivo aunque no siempre proporcional a la concentración (figura 32B). Finalmente, vemos como los valores de fluorescencia citoplasmáticos se mantienen prácticamente constantes en todas las concentraciones de incubación con zinc, a excepción de la concentración de zinc 200 μM donde vemos un aumento significativo en los valores de fluorescencia de los zincosomas (figura 32C).

Por lo que podemos deducir que, durante la incubación con zinc exógeno, las células van capturando el zinc del espacio extracelular y lo almacenan formando zincosomas, que aumentan en densidad y tamaño conforme aumenta la concentración del zinc exógeno durante la incubación.

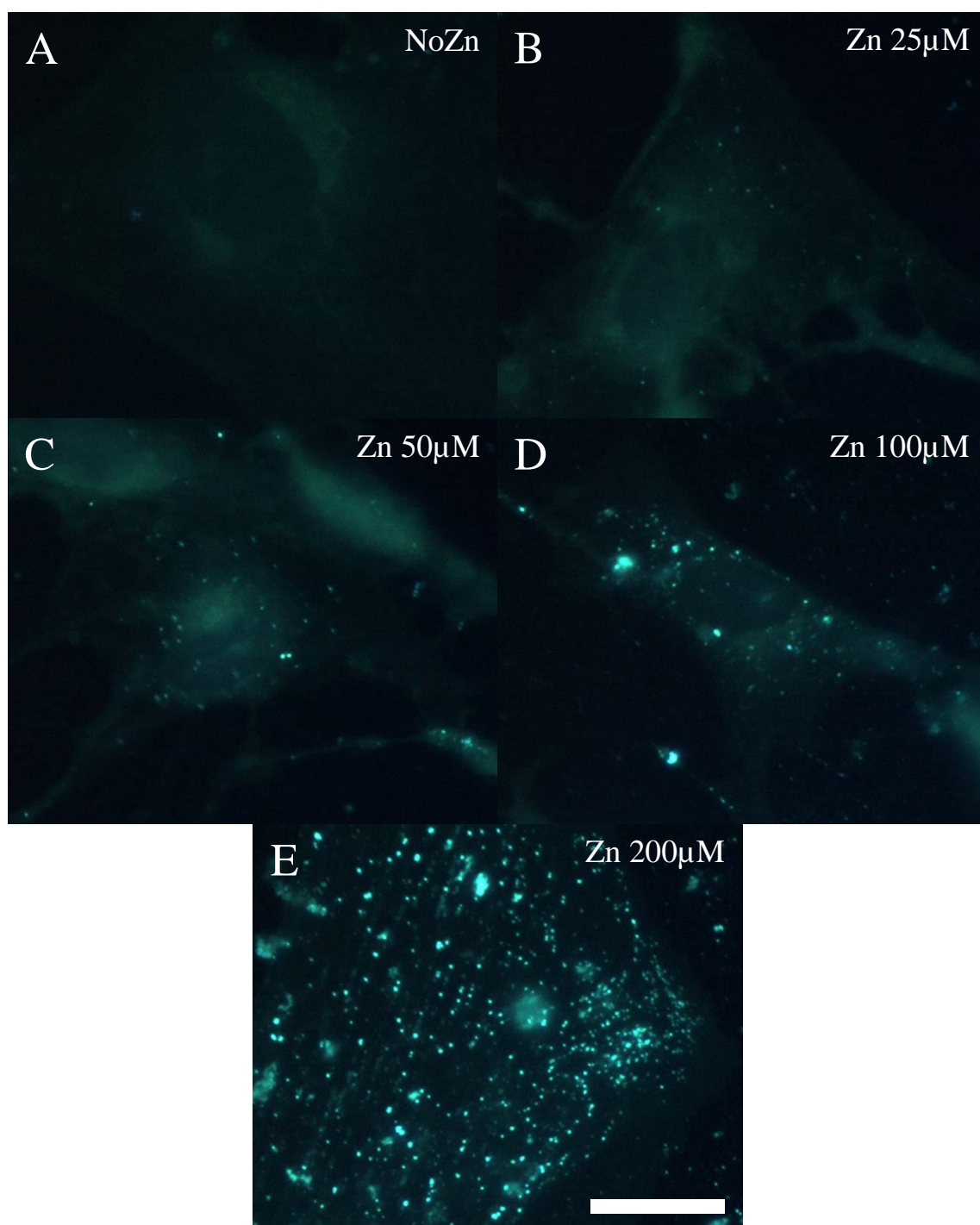


Figura 31. Formación de zincosomas con diferentes concentraciones de zinc (I).

Imagen representativa de astrocitos incubados con pulsos de 10 minutos con zinc exógeno a distintas concentraciones y posteriormente marcados con el fluorocromo TSQ. Podemos observar, cómo sin zinc las células no muestran zincosomas (A), solamente una pequeña marca difusa en el citosol. Con 25 μM ZnSO_4 (B) ya podemos ver unos pocos zincosomas brillantes en el citosol. Y conforme vamos aumentando la concentración de zinc, observamos cómo éstos van aumentando en densidad y tamaño (C, D y E). Escala: 20 μm .

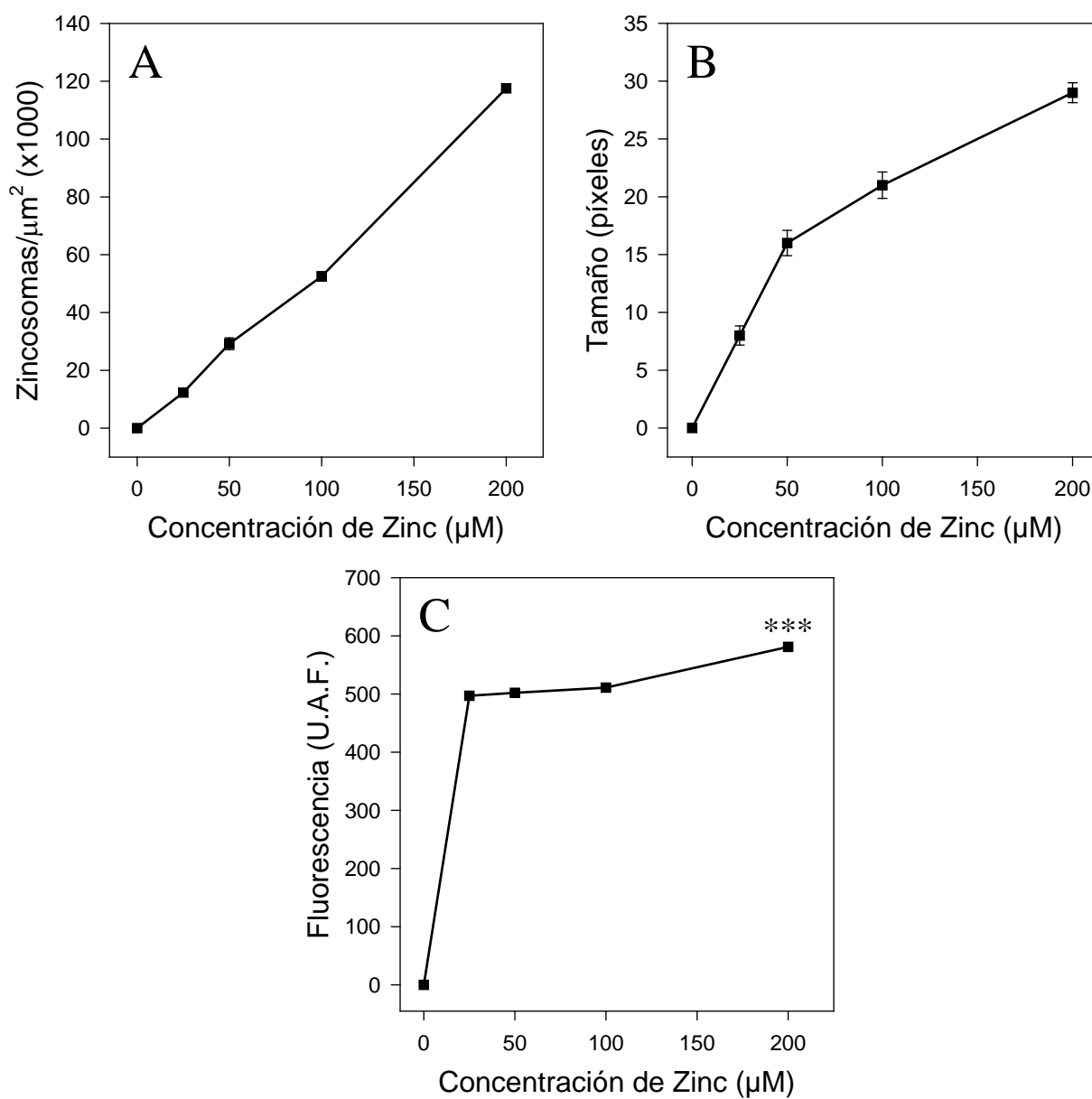


Figura 32. Formación de zincosomas con distintas concentraciones de zinc (II).

Gráfica mostrando el aumento proporcional que hay entre la densidad de zincosomas y la concentración de zinc exógeno en (A). En (B) se relaciona el tamaño de los zincosomas con la concentración de zinc exógeno, observándose un aumento progresivo respecto a la concentración de zinc. En (C), los niveles de fluorescencia de los zincosomas se mantienen prácticamente constantes, aumentando significativamente con la máxima concentración de zinc. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student, *** $p < 0,001$, $n = 92$ células).

1.6 Determinación de la tipología organular de los zincosomas.

Para determinar qué tipo de orgánulos eran los zincosomas, se realizaron diferentes ensayos para estudiar si había colocalización entre el marcador de zinc TSQ y los distintos marcadores de orgánulos celulares. Los astrocitos fueron incubados con TPEN y a continuación se les dio un pulso de zinc. Posteriormente, se realizó un marcaje de zinc con el marcador TSQ (figura 33A) junto con otros marcadores específicos de distintos orgánulos: FM1-43 para endosomas tempranos (figura 33B), LysoTracker para lisosomas y MitoTracker para mitocondrias. Observamos cómo, de todos los marcadores utilizados, ni el LysoTracker ni el MitoTracker mostraron marca alguna (datos no mostrados), solo el marcador de endosomas tempranos FM1-43 mostró colocalización con el marcaje del TSQ (figura 33C). Las marcas con cada uno de los fluorocromos se distribuyeron por el citosol de forma uniforme (figura 33A-B). Este marcaje puntuado específico y abundante dificultaba la colocalización entre ambos marcadores, sin embargo, se buscaron algunas células con una baja densidad de zincosomas marcados que permitió su mejor observación y análisis de la colocalización. Finalmente, algunas vesículas de endocitosis FM1-43 positivas, fueron también marcadas con el fluorocromo para el zinc, TSQ (figura 33C), viéndose claramente la colocalización entre el marcador de endosomas tempranos y el de zincosomas.

Por lo que podemos deducir que, los zincosomas tienen un origen endocítico como ha demostrado la colocalización del marcador de zincosomas TSQ, con el marcador de endosomas tempranos FM1-43.

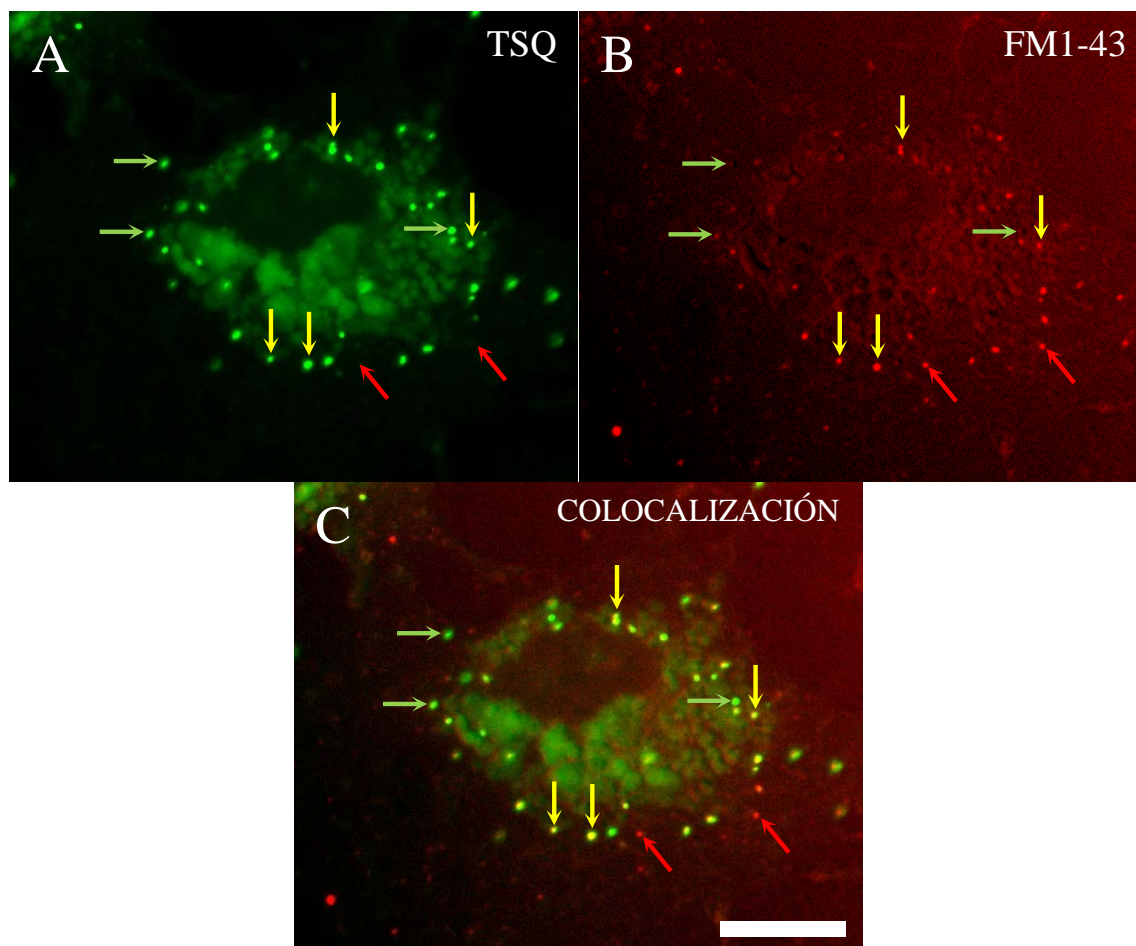


Figura 33. Colocalización del marcador de zinc TSQ, con el marcador de endosomas tempranos FM1-43. Imagen representativa de astrocitos donde los zincosomas aparecen marcados con TSQ y distribuidos al azar por toda la célula (flechas verdes y amarillas) (A). En (B), los endosomas tempranos marcados con FM1-43 también están distribuidos homogéneamente por toda la célula (flechas rojas y amarillas). En (C), se muestran ambos marcadores, y la colocalización de algunas estructuras celulares con doble marcaje (flechas amarillas) coexistiendo al mismo tiempo con otras de marcaje simple (flechas verdes, zinc-TSQ o flechas rojas, endosomas tempranos). Escala: 20 μm .

2. ESTABILIZACIÓN DEL COMPLEJO Zn-TSQ.

Para poder estudiar el proceso de captación del zinc exógeno en astrocitos en cultivo, y ver como éste varía con los distintos tratamientos, teníamos que asegurarnos de que el zinc capturado por los astrocitos durante el pulso de zinc exógeno no se perdía con los distintos tratamientos posteriores. La estabilización del zinc era necesaria para su posterior detección mediante diferentes técnicas postfijación y postinclusión, como el revelado autometalográfico de Neo-Timm o método de Danscher y la localización del zinc al MET. Para la estabilización del zinc, se ensayaron distintas variantes de protocolos, para determinar con cuál de ellas conseguíamos una mejor conservación del zinc iónico en las células.

2.1. Efecto del fijador sobre el marcaje fluorescente de los zincosomas con TSQ.

Para determinar qué fijador conservaba mejor el zinc iónico captado por los astrocitos en cultivo, se ensayaron tres soluciones fijadoras habitualmente empleadas para la histoquímica del zinc: PFA 4%, GA 4% y la mezcla PFA 1%-GA 1%. Las células se incubaron con TPEN, se les aplicó un pulso de 50 μ M ZnSO₄ durante 10 minutos y se marcó el zinc con el fluorocromo TSQ. Posteriormente se fotografiaron las monocapas con las células vivas que se usaron como controles (figura 34A). A continuación, otras monocapas marcadas con TSQ pero no expuestas a la luz ultravioleta del microscopio de fluorescencia, se fijaron con las distintas soluciones y se fotografiaron para su análisis (figuras 34B-D). Pudimos ver cómo había diferencias en los niveles de fluorescencia citosólica de las células entre las distintas soluciones fijadoras tras la fijación. Como se puede ver en la figura 34, con todas las soluciones fijadoras se produjo una pérdida de fluorescencia, siendo los astrocitos fijados con PFA 4% (B) y con la mezcla PFA 1%-GA 1% (C) los que mostraron una menor reducción en los niveles de fluorescencia. Por el contrario, las células fijadas con GA 4% (D), mostraron una gran reducción de los niveles de fluorescencia, tanto respecto a las células vivas, como a las células fijadas con PFA 4% y PFA 1%-GA 1%. Con lo que podemos concluir que el fijador PFA 4% es el que menos afecta a la fluorescencia vista con células vivas, seguramente por estabilidad del complejo zinc-TSQ.

Tras cuantificarse los valores de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 35), podemos observar como los astrocitos, tras la fijación, sufren un descenso significativo en la densidad de zincosomas marcados con TSQ con respecto a las células vivas (A). Este descenso es del 19% con el fijador PFA 4%, del 14% en el caso del PFA 1%-GA 1% y el descenso más acusado lo obtenemos con el GA 4% con un 56% respecto a las células vivas (*t* de Student, *p* < 0,001). También se puede apreciar cómo, los astrocitos tras la fijación, presentan una reducción en el tamaño de los zincosomas (B), siendo la reducción significativa en el caso del fijador GA 4% con un 33% y del 22% en el caso del PFA 1%-GA 1%, mientras que con el fijador

PFA 4% no se aprecia ningún cambio en el tamaño de los zincosomas (t de Student, $p < 0,001$). Finalmente, se cuantificó el nivel de fluorescencia que presentaban tanto los astrocitos vivos como tras las distintas fijaciones. El resultado fue que nuevamente con los fijadores hay una pérdida de fluorescencia en las células, que en el caso del PFA 4% es del 14%, pero con el GA 4% y el PFA 1%-GA 1% es mucho más acusada, un 68% en ambos casos (t de Student, $p < 0,001$).

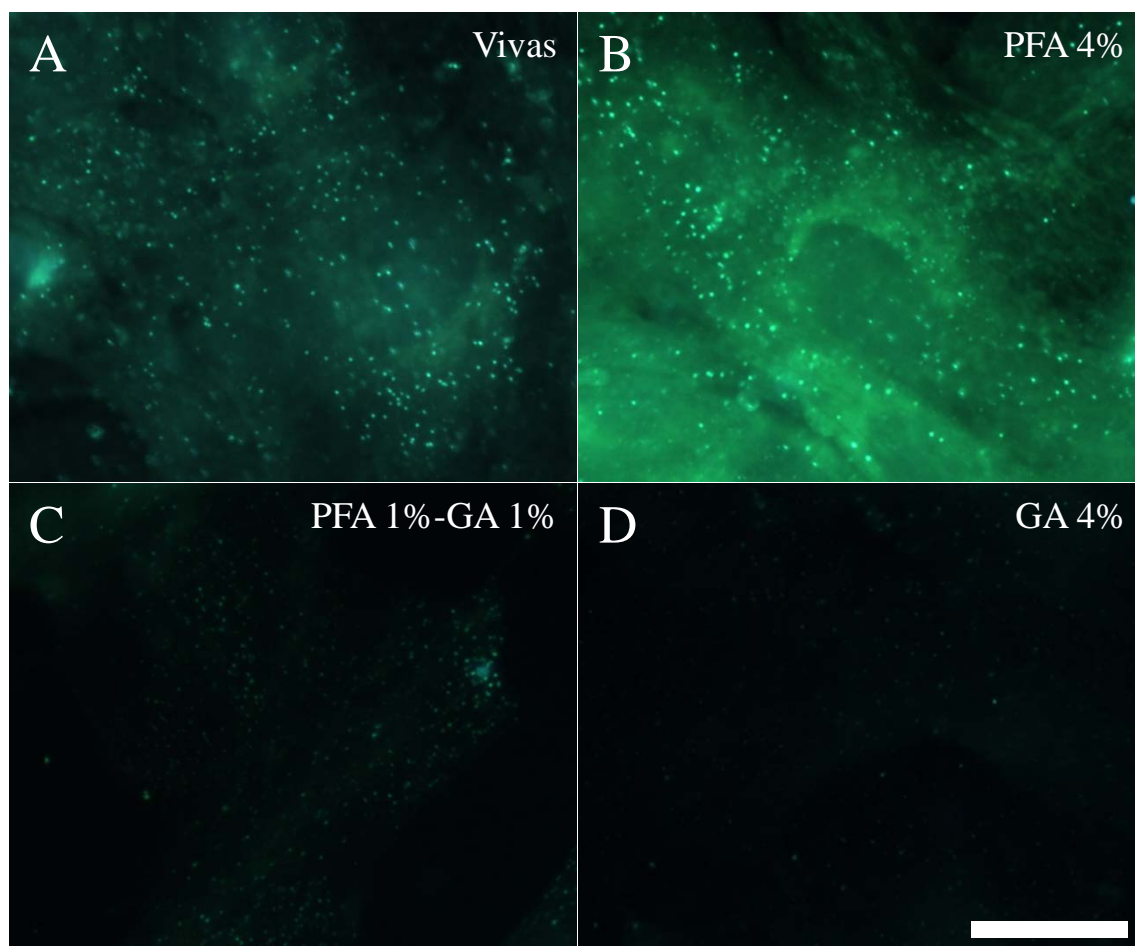


Figura 34. Prueba de fijadores para estabilizar el zinc iónico (I).

Imagen representativa mostrando las monocapas fotografiadas con fluorescencia de TSQ, tanto en células vivas (A) como tras la fijación con las distintas soluciones fijadoras (B-D). Las células se incubaron con TPEN, a continuación se les dio un pulso de 50 μM de ZnSO_4 durante 10 minutos y finalmente se incubaron con TSQ. Posteriormente, se fotografiaron unas monocapas con las células vivas y otras tras las distintas soluciones fijadoras. En (A) las células vivas presentan una gran densidad de zincosomas al igual que un alto nivel de brillo. En (B) las monocapas de astrocitos fijadas con PFA 4% muestran una menor densidad de zincosomas y un menor nivel de fluorescencia respecto a las células vivas, aunque no vemos diferencias en el tamaño de los zincosomas. En (C y D) con los astrocitos fijados con PFA 1%-GA 1% y GA 4% respectivamente, encontramos una reducción importante en la densidad de zincosomas aunque más notable con GA 4%, así como un menor tamaño y nivel de brillo de éstos en comparación con las células vivas y también con respecto a las células fijadas con PFA 4%. Escala: 20 μm .

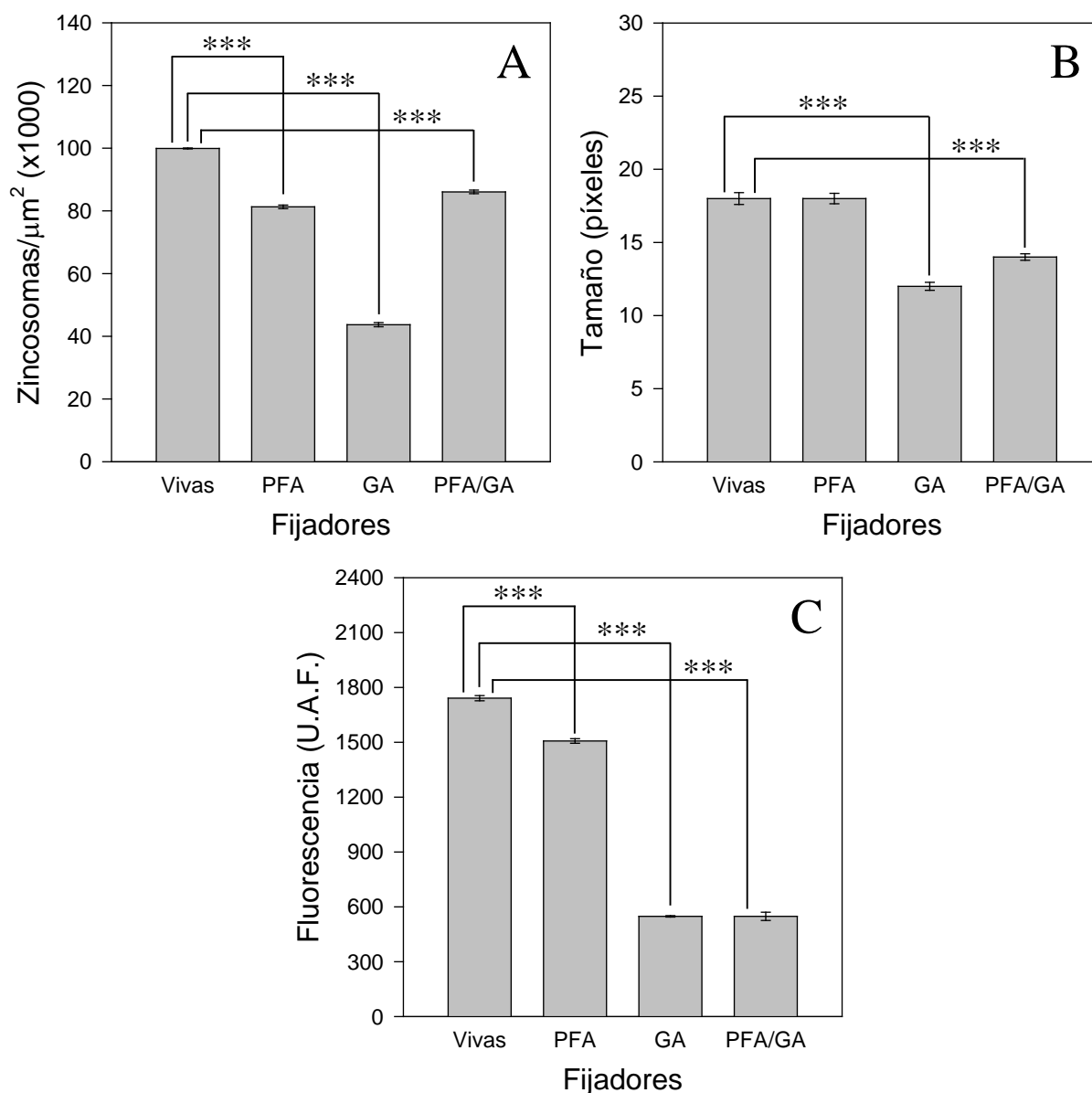


Figura 35. Prueba de fijadores para estabilizar el zinc iónico (II).

Gráfica mostrando como todos los fijadores disminuyen la densidad de zincosomas marcados con TSQ de forma significativa, en especial el GA 4% (A). En (B) se muestra el tamaño de los zincosomas, con una reducción significativa en el tamaño de las muestras fijadas con GA 4% y PFA 1%-GA 1%, siendo inapreciable en las muestras fijadas con PFA 4%. En (C) vemos la fluorescencia de los zincosomas tras la fijación, y como disminuye significativamente con todas las soluciones fijadoras, siendo más acusada con los fijadores GA 4% y PFA 1%-GA 1%. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, *** $p < 0,001$, $n = 104$ células).

Por lo que concluimos que, utilizar el fijador PFA 4% es la mejor manera de conservar el zinc iónico detectable con TSQ, ya que la utilización de otras soluciones fijadoras como el GA 4% y el PFA 1%-GA 1% producen una pérdida significativa de los niveles de fluorescencia, tamaño y densidad de zincosomas que reflejaría una pérdida de zinc iónico que dificulta su detección posterior con otras técnicas.

2.2 Efecto del pH del fijador sobre el marcaje fluorescente de los zincosomas con TSQ.

El zinc es un ion muy sensible a los cambios de pH, haciendo que tanto pH ácidos como básicos disuelvan el zinc iónico y se pierda, provocando que ya no pueda ser detectado posteriormente mediante Neo-Timm o MET. Para determinar si el pH del fijador era un factor importante en el proceso de conservación del zinc iónico aplicado a los astrocitos en cultivo para ser detectado posteriormente, se llevaron a cabo diversos ensayos utilizando soluciones fijadoras de PFA 4% preparadas con tampones de distinto pH: 6,0, 7,4 y 8,0. Para ello, las células se incubaron primeramente con el quelante TPEN, posteriormente se les aplicó un pulso de 50 μ M de zinc durante 10 minutos y finalmente se marcó el zinc con el fluorocromo TSQ y se fotografiaron (figura 36A). A continuación, otras monocapas marcadas con TSQ pero no expuestas a la luz ultravioleta del microscopio de fluorescencia, se fijaron con las distintas soluciones fijadoras a distinto pH y se fotografiaron para su estudio (figuras 34B-D). Los lavados posteriores a la fijación se hicieron con el tampón al mismo pH que el utilizado durante la fijación. Se puede ver cómo hay diferencias entre los niveles de fluorescencia tras la fijación de los astrocitos con las soluciones fijadoras a distintos pH. Como se puede apreciar en la figura 36, los astrocitos fijados con PFA pH 7,4% (C) mostraron una densidad de zincosomas similar a los obtenidos en las células vivas (A). Sin embargo, las células fijadas con PFA pH 6,0 (B) o con PFA pH 8,0 (D), mostraron una reducción en la densidad de zincosomas respecto a las células vivas y también respecto a las células fijadas con PFA pH 7,4. Por lo que podemos concluir que el fijador PFA con pH 7,4 conserva mejor el zinc iónico en los astrocitos en cultivo, permitiendo así su posterior detección con otras técnicas.

Tras cuantificarse los valores de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 37), podemos observar como los astrocitos tras la fijación sufren un descenso significativo en la densidad de zincosomas marcados con TSQ con respecto a las células vivas (como sucedía en el apartado 2.1). Esto supone un descenso del 20% con el fijador PFA pH 7,4%, del 70% en el caso del PFA pH 6,0 y de un 73% con el fijador PFA pH 8,0 respecto a las células vivas (*t* de Student, $p < 0,01$ y $p < 0,001$). También se puede apreciar como los astrocitos tras la fijación presentan una reducción en el tamaño de los zincosomas, siendo la reducción significativa en el caso del PFA pH 6,0 con un 33% (*t* de Student, $p < 0,01$) y del 4% en el caso del PFA pH 8,0, mientras

que con el fijador PFA pH 7,4% no hay ningún cambio en el tamaño de los zincosomas respecto de las células vivas. Finalmente, se cuantificó el nivel de fluorescencia que presentaban los astrocitos vivos y tras la fijación con PFA a distintos pH. El resultado fue que, los fijadores provocan un descenso significativo de los niveles de fluorescencia celular, siendo este descenso similar a todos los tratamientos tras la fijación, siendo para el PFA pH 6,0 del 18%, para el PFA pH 7,4 del 15% (*t* de Student, $p < 0,01$) y del 11% para el PFA pH 8,0 respecto a las células vivas.

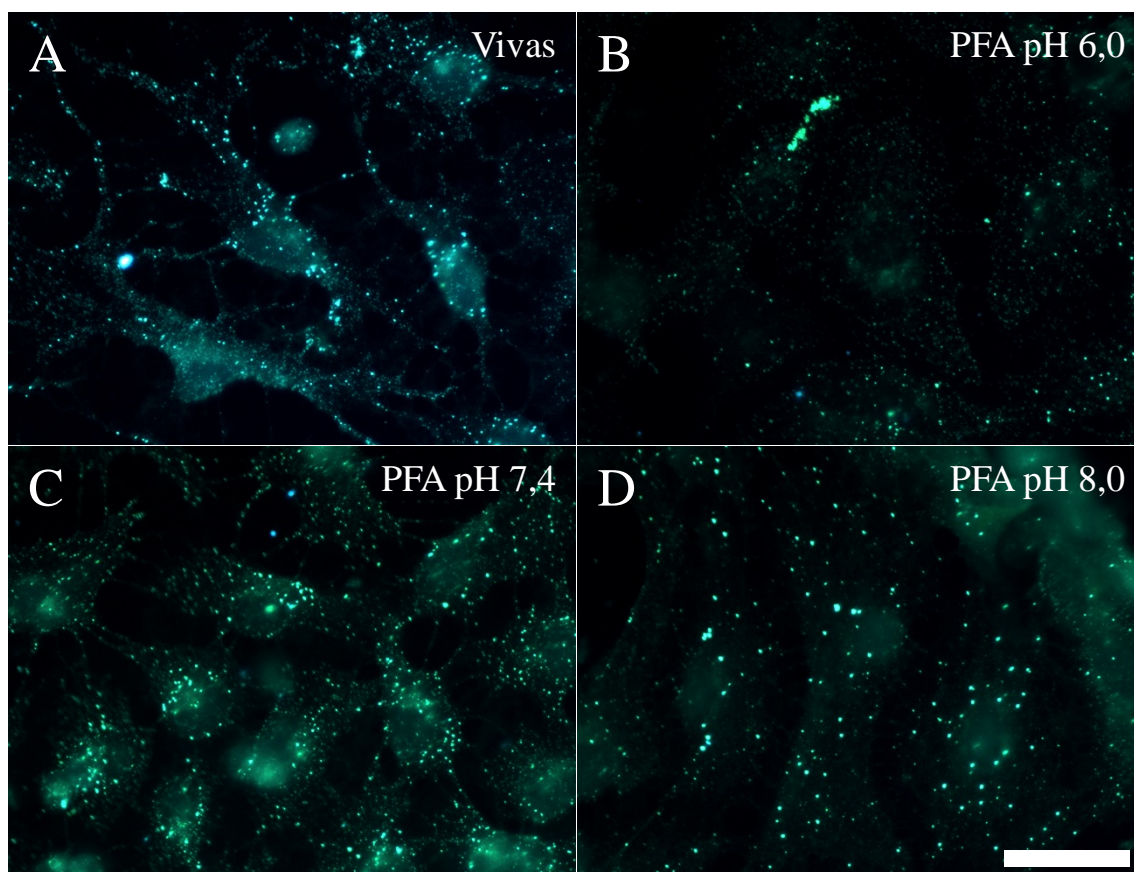


Figura 36. Fijación del zinc con PFA a distintos pH (I).

Imagen representativa mostrando las monocapas fotografiadas con fluorescencia de TSQ, tanto en células vivas (A) como tras la fijación con las soluciones fijadoras a distinto valor de pH (B-D). Las células se incubaron con TPEN, se les dio un pulso de 50 μM de ZnSO_4 durante 10 minutos y finalmente se incubaron con TSQ. A continuación, se fotografiaron unas monocapas con las células vivas y otras tras incubarse con las soluciones fijadoras a distintos valores de pH. En (A) las células vivas presentan una gran densidad de zincosomas al igual que un alto nivel de brillo. En (B) las monocapas de astrocitos fijadas con PFA a pH 6,0 muestran una reducción significativa en la densidad y tamaño de los zincosomas, y del nivel de fluorescencia respecto a las células vivas. En (C) los astrocitos fijados con PFA a pH 7,4 muestran un menor número de zincosomas marcados, pero no tan acusado como los fijadores a pH 6,0 y 8,0, el tamaño no se ve alterado y los niveles de fluorescencia disminuyen respecto a las células vivas. En (D) con el fijador PFA a pH 8,0 encontramos un gran descenso en la densidad de zincosomas, mientras que el tamaño de estos y los niveles de fluorescencia no se ven alterados de forma significativa. Escala: 30 μm .

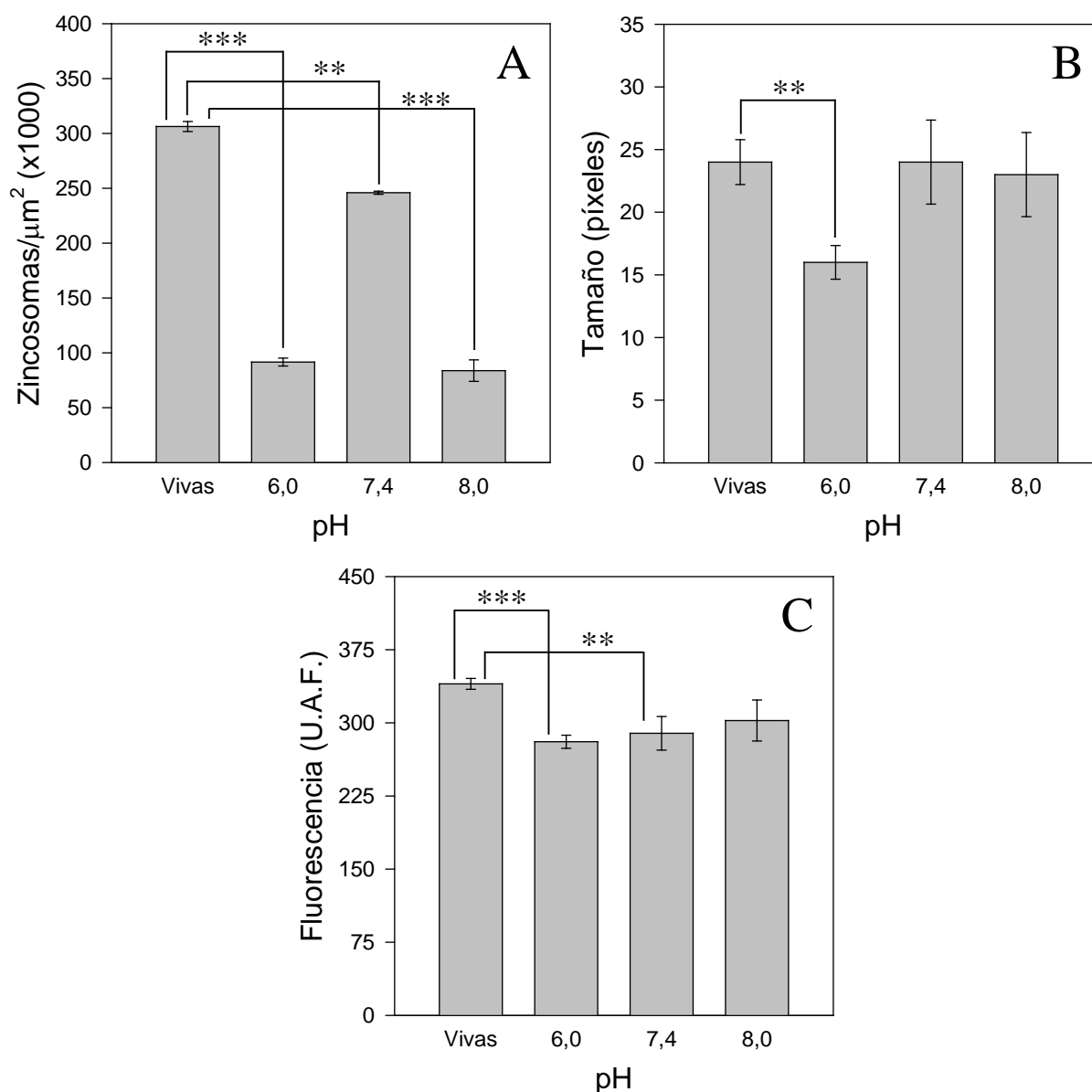


Figura 37. Fijación del zinc con PFA a distintos pH (II).

Gráfica mostrando como los fijadores con pH 6,0 y 8,0 poseen una reducción significativa en la densidad de zincosomas marcados con TSQ respecto a los astrocitos vivos y fijados con PFA a pH 7,4, que también muestran una reducción pero menos acentuada (A). En (B) vemos como los zincosomas fijados a pH 7,4 y 8,0 son similares en tamaño a los zincosomas de las células vivas, siendo los zincosomas fijados con PFA a pH 6,0 significativamente más pequeños. En (C) vemos como los niveles de fluorescencia de las células vivas son similares a los fijadores con los 3 valores de pH, siendo las diferencias solo significativas con los pH 6,0 y 7,4. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 96$ células).

Por lo que podemos concluir que, la mejor manera de conservar el zinc iónico detectable con TSQ es utilizar el fijador PFA 4% con pH 7,4, ya que es la solución fijadora que mejor conserva el zinc y que menor pérdida produce de los niveles de fluorescencia, tamaño y densidad de zincosomas en comparación con los otros dos fijadores a pH 6,0 y 8,0, lo que reflejaría una diferencia en el zinc iónico necesario para su posterior detección con otras técnicas.

2.3 Efecto del TSQ tras la fijación sobre el marcaje fluorescente de los zincosomas.

Tras determinar que el fijador y el pH reducen la intensidad de fluorescencia, se llevaron a cabo ensayos para comprobar si el zinc contenido en los zincosomas se había perdido con la fijación. Para ello se incubaron las células primeramente con TPEN, a continuación se les dio un pulso de zinc y este se marcó con el fluorocromo TSQ para finalmente fotografiarse. Algunas placas de astrocitos fueron incubadas en paralelo, y tras fijarse con PFA 4% en condiciones óptimas (PFA 4%, pH 7,4), se incubaron de nuevo con TSQ durante 10 minutos con el objetivo de intentar revertir la pérdida de fluorescencia producida por el fijador, si el zinc no se había perdido.

Se puede ver en la figura 38, los astrocitos incubados con zinc exógeno y marcados con TSQ mostraban el típico patrón punteado fluorescente de los zincosomas (A), siendo la marca sin zinc inexistente (C). Vemos cómo los astrocitos con la incubación de TSQ adicional tras el fijador, muestran zincosomas más brillantes y grandes que las células vivas, aunque en menor número (C). También se puede apreciar como los astrocitos sin el pulso de zinc exógeno, tras la segunda incubación de TSQ, no muestran ningún tipo de marca fluorescente (D).

Tras cuantificarse los valores de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 39), podemos observar como los astrocitos incubados una segunda vez con TSQ tras la fijación sufren un descenso significativo del 18% en la densidad de zincosomas con respecto a las células vivas incubadas una vez con TSQ (*t* de Student, $p < 0,001$). También se puede apreciar como los astrocitos incubados una segunda vez con TSQ presentan zincosomas con un tamaño significativamente mayor, llegando a ser casi 5 veces más grandes en comparación con los zincosomas de las células vivas (*t* de Student, $p < 0,001$). Finalmente, se cuantificaron los niveles de fluorescencia, dando como resultado unos niveles significativamente mayores en las células con una segunda incubación con TSQ respecto a las células vivas de casi el doble (*t* de Student, $p < 0,001$).

Con lo que podemos concluir que, una segunda incubación de las monocapas de astrocitos tras el fijador, ayuda a recuperar parte de la marca fluorescente de los zincosomas que se pierde normalmente tras la fijación. En el caso de las células incubadas previamente con zinc, la segunda incubación con TSQ aumenta la marca ya obtenida tras la primera incubación, pero solo de los

zincosomas de mayor tamaño, perdiéndose la marca fluorescente de los zincosomas más pequeños. Este segundo marcaje con TSQ, permite hacer un seguimiento de los zincosomas con mayor facilidad debido a su mejor marcaje. Y en el caso de las células sin la incubación de zinc, la segunda incubación con TSQ no genera artefactos o falsos positivos, obteniendo un resultado similar al obtenido con una incubación de TSQ sobre las células vivas.

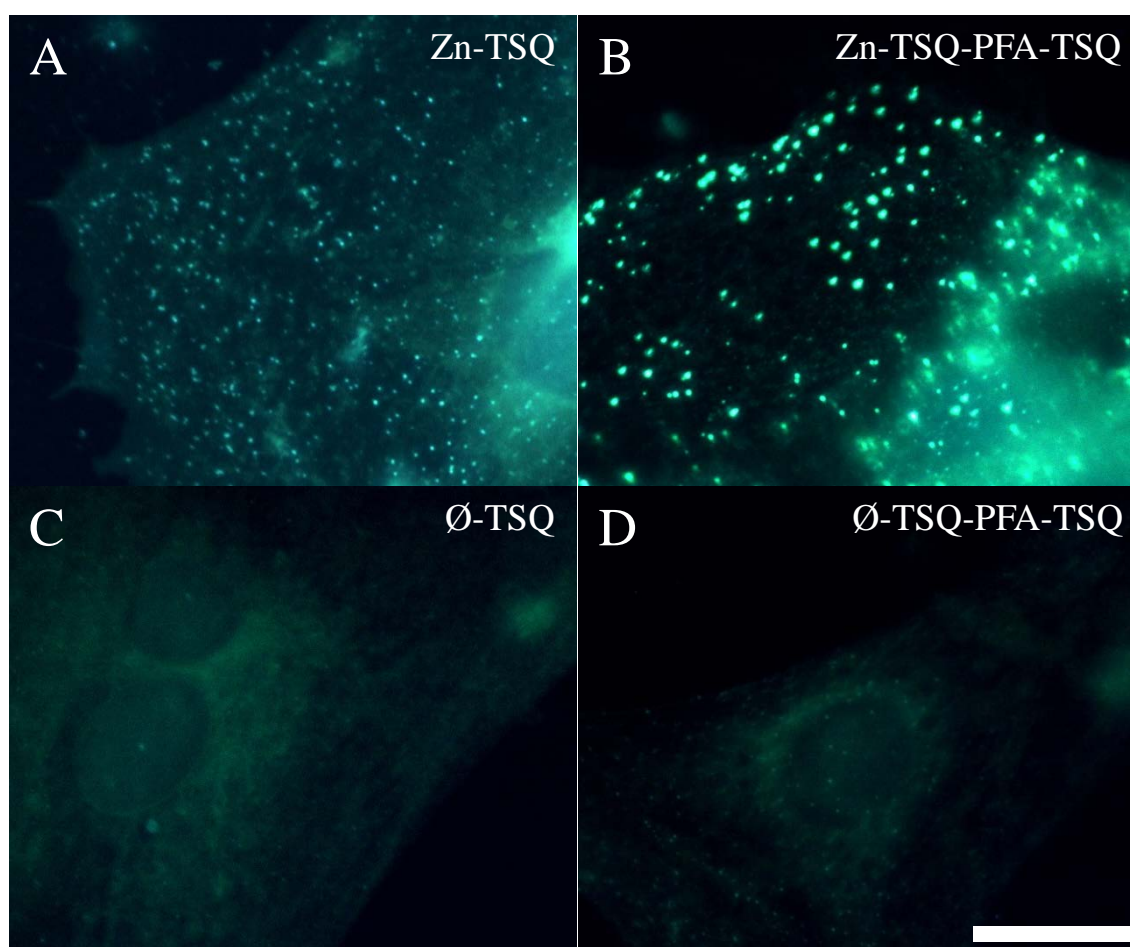


Figura 38. Efecto de la segunda incubación con TSQ postfijación sobre el marcaje de los zincosomas (I). Imagen representativa mostrando astrocitos vivos con zincosomas brillantes marcados con TSQ de forma uniforme por todo el citosol en (A). En (B) otra monocapa a la que tras la fijación con PFA se la incubó nuevamente con TSQ, mostrando zincosomas más brillantes y de mayor tamaño, aunque en menor densidad en comparación con las vivas. En (C) vemos astrocitos sin el pulso de zinc exógeno sin zincosomas marcados. En (D) otra monocapa de astrocitos sin pulso de zinc, vemos cómo con la segunda incubación de TSQ tras la fijación, continúan sin mostrar zincosomas marcados. Escala: 20 μ m.

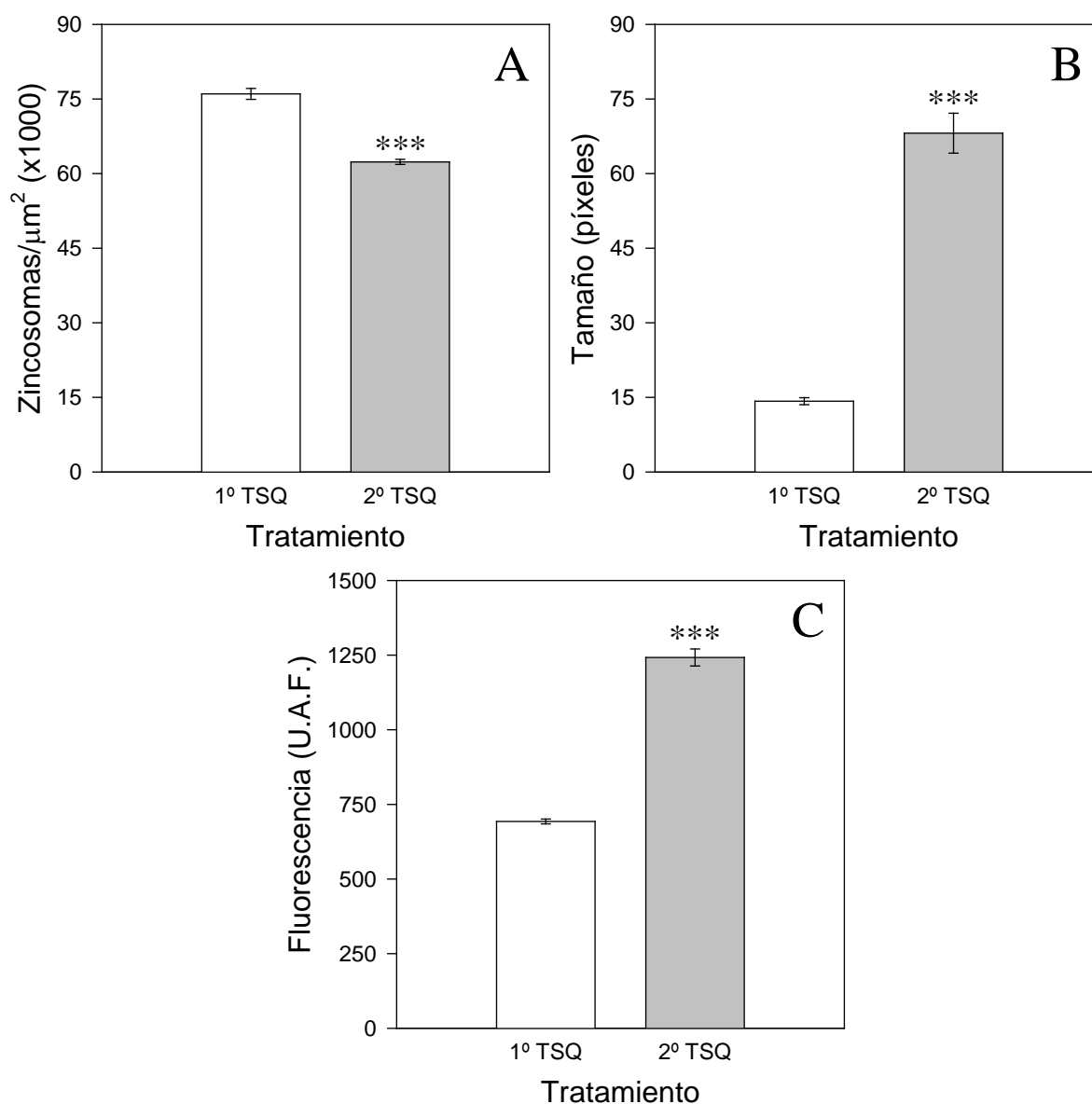


Figura 39. Efecto de la segunda incubación con TSQ postfijación sobre el marcaje de los zincosomas (II). Gráfica mostrando como los astrocitos vivos incubados con TSQ poseen una densidad de zincosomas marcados significativamente mayor respecto a los astrocitos incubados una segunda vez con TSQ tras la fijación (A). En (B) vemos como de los zincosomas marcados con la segunda incubación con TSQ son significativamente mayores que con solo una incubación con TSQ. En (C) vemos como los niveles de fluorescencia de los zincosomas de las células vivas son significativamente menos brillantes que los zincosomas de los astrocitos incubados una segunda vez con TSQ tras la fijación. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student, *** $p < 0,001$, $n = 64$ células).

3. DETECCIÓN DEL ZINC MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA.

Para el estudio de la captación del zinc en astrocitos en cultivo, además de las técnicas de microscopía de fluorescencia, también se utilizó la técnica de revelado autometalográfico de Danscher o Neo-Timm, para detectar el zinc iónico de las células en cultivo. Se utilizó esta técnica porque utiliza material fijado, lo que facilita su manipulación, por su alta sensibilidad en la detección de zinc, y por su estabilidad en el tiempo, ya que las muestras, una vez reveladas y montadas, pueden durar varios años (Danscher *et al.*, 1981).

3.1 Precipitación del zinc con selenito sódico.

El selenito sódico ha sido ampliamente usado en animales para el estudio del zinc en rebanadas de cerebro tanto de mamíferos como de reptiles (Danscher, 1982). Por ese motivo, se utilizó el selenito sódico como agente precipitante de zinc en monocapas incubadas con un pulso de zinc exógeno. Para ello los astrocitos en cultivo se dividieron en 2 grupos, unos se incubaron con 50 μM ZnSO_4 y otros se utilizaron como controles incubándose únicamente con medio nuevo. Posteriormente, las células se incubaron con selenito sódico durante 20 minutos para precipitar el zinc. Y finalmente, las monocapas se fijaron con PFA 4% y se revelaron con el método de Neo-Timm.

Como se puede apreciar en la figura 40, el resultado del revelado autometalográfico fue una marca de plata metálica homogénea por todo el citoplasma de las células, tanto en las monocapas con el pulso de zinc exógeno (A y C), como en las monocapas sin pulso de zinc (B y D). Este resultado se puede apreciar tanto en imágenes de campo claro (A-B), como en imágenes de campo oscuro (C-D).

Por lo que podemos concluir que, el selenito sódico no es un agente precipitante de zinc adecuado para el estudio de la captación de zinc en astrocitos en cultivo, ya que tras el revelado, obtenemos depósitos de plata Timm positivos tanto en las células con el pulso de zinc como en las células sin él, lo que impide su estudio y comparación.

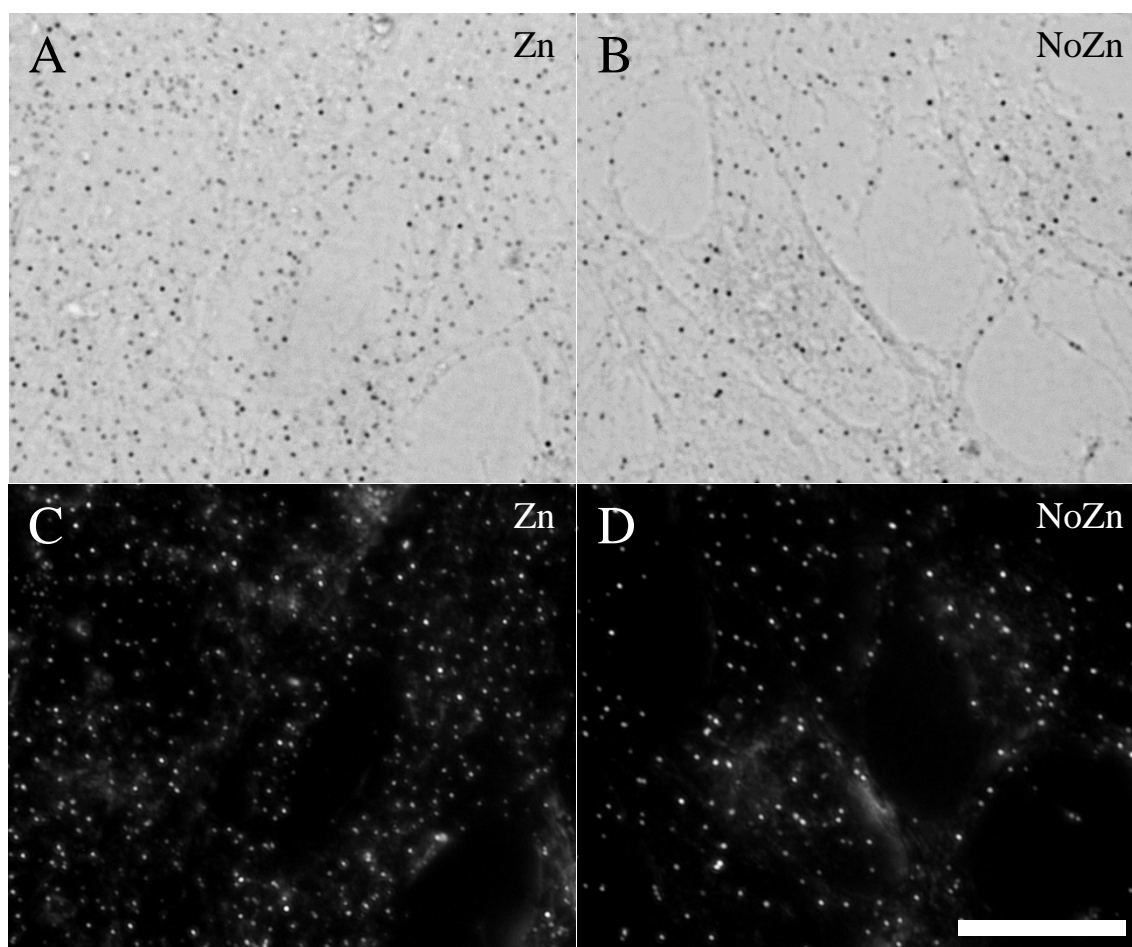


Figura 40. El selenito sódico como agente precipitante del zinc.

Imagen representativa mostrando astrocitos en cultivo con zincosomas marcados tras el revelado con el método autometalográfico de Neo-Timm tras la incubación con zinc exógeno y utilizando selenito sódico como agente precipitante de zinc en (A). En (B) vemos una imagen similar de los zincosomas, pero en este caso sin el pulso de zinc exógeno. Se pueden observar mejor las similitudes entre las células con y sin zinc exógeno en las imágenes de campo oscuro (C y D respectivamente). Escala: 20 μm .

3.2 Precipitación del zinc con sulfuro sódico.

El sulfuro sódico es un agente precipitante de zinc, que al igual que el selenito sódico, también ha sido ampliamente usado en animales para posteriormente poder detectar el zinc mediante el revelado autometalográfico. Por ese motivo, se utilizó el protocolo propuesto por Danscher *et al.* (1981) pero en este caso adaptado a los astrocitos en cultivo. Se realizaron ensayos en los que se utilizó el sulfuro sódico, tanto en monocapas incubadas con un pulso de zinc exógeno, como en monocapas utilizadas como controles sin pulso de zinc. Posteriormente, las células se fijaron con PFA 4% y se precipitó el zinc con sulfuro sódico. Finalmente, las monocapas se revelaron con el método de Neo-Timm.

En la figura 41 podemos observar el resultado tras el revelado autometalográfico de Neo-Timm, en el cual solo aparece marca del precipitado de plata metálica de forma homogénea por el citoplasma en las células que habían sido incubadas con un pulso de zinc exógeno (A y C), mientras que las células sin el pulso de zinc exógeno no mostraron ningún tipo de marca (B y D). Este resultado se puede apreciar en imágenes de campo claro (A-B), y también en imágenes de campo oscuro (C-D).

Podemos concluir que, el sulfuro sódico es capaz de precipitar el zinc iónico para poder revelarlo posteriormente por autometalografía. Este marcaje con el revelado de Neo-Timm se realiza únicamente sobre las células con el pulso de zinc, y no sobre las células sin zinc añadido, por lo que podemos afirmar que el sulfuro sódico es un agente precipitante de zinc adecuado para el estudio de la captación de zinc en astrocitos en cultivo mediante autometalografía.

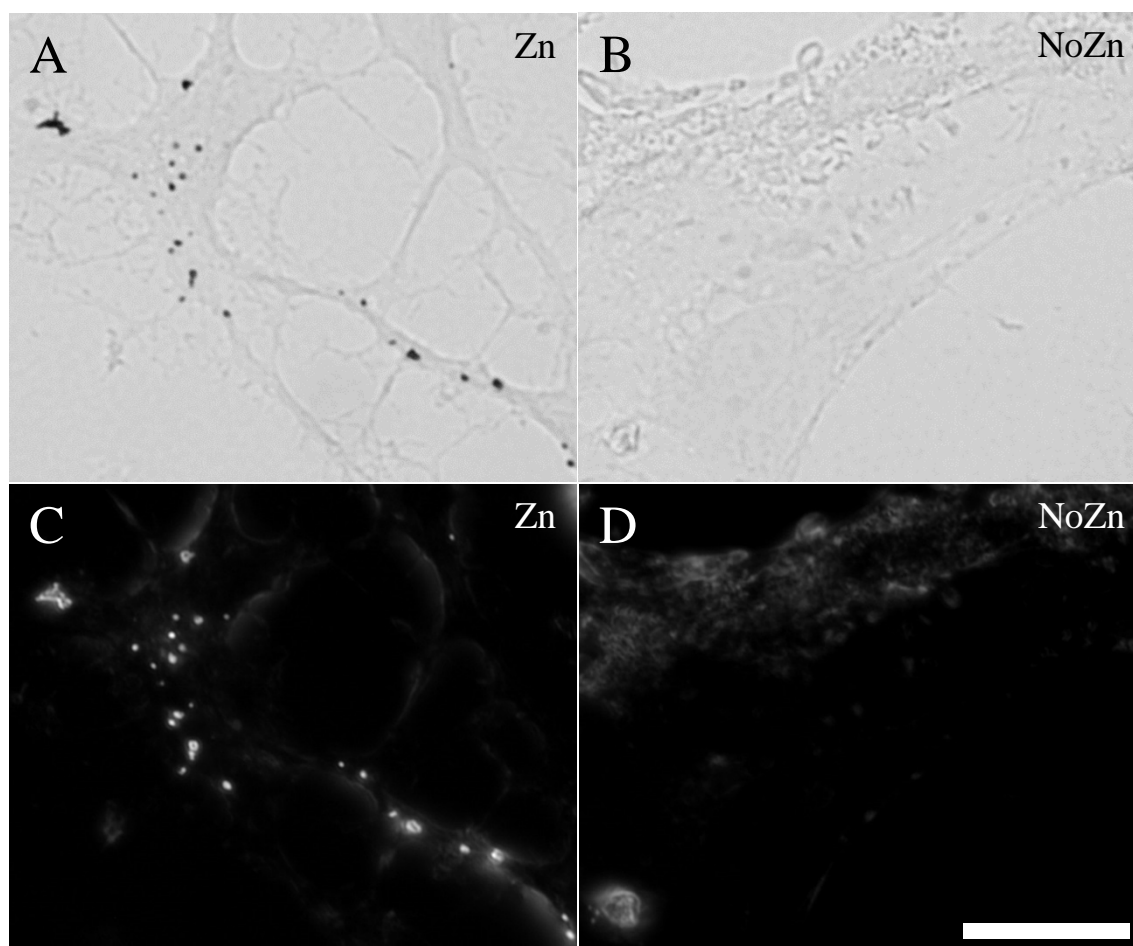


Figura 41. El sulfuro sódico como agente precipitante del zinc.

Imagen representativa mostrando astrocitos en cultivo con zincosomas marcados tras el revelado con el método autometalográfico de Neo-Timm tras la incubación con zinc exógeno y utilizando sulfuro sódico como agente precipitante de zinc en (A). En (B) vemos una imagen de los astrocitos sin el pulso de zinc exógeno tras ser revelados con Neo-Timm sin ningún tipo de marca de plata en el citoplasma. Se pueden observar mejor las diferencias entre las células con y sin zinc exógeno en las imágenes de campo oscuro (C y D respectivamente). Escala: 20 μm .

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

4. ULTRAESTRUCTURA DE LOS ZINCOSOMAS.

4.1 Caracterización ultraestructural de los zincosomas marcados con TSQ.

Con la finalidad de caracterizar la ultraestructura de los zincosomas mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), se usó el proceso de marcaje de los zincosomas con fluorescencia de TSQ y posteriormente se llevó a cabo la correlación entre la microscopía de fluorescencia y la electrónica. Para ello se utilizaron astrocitos en cultivo primario, los cuales se incubaron previamente con TPEN, se les dio un pulso de 50 μM ZnSO_4 de 10 minutos, se marcaron con el fluorocromo TSQ y finalmente se tomaron fotos para hacer el seguimiento de los zincosomas al MET. Como se puede ver en la figura 55, los astrocitos mostraron un claro marcaje de los zincosomas por todo el citosol, presentando muchos zincosomas de diferentes tamaños (A). Los zincosomas más grandes, también se detectaron fácilmente en el microscopio de campo claro (B). Los astrocitos se fijaron inmediatamente con PFA tras tomar las fotografías. Tras la inclusión en resina TAAB, las células previamente identificadas y localizadas por fluorescencia y campo claro (D) fueron cortadas en series de cortes ultrafinos (C). Los zincosomas detectados anteriormente con TSQ pudieron ser detectados con microscopía electrónica como vesículas aparentemente vacías, con un diámetro aproximado de 450 nm (E y F).

En la figura 56 se muestra astrocitos en cultivo con MET, estos presentan una gran cantidad de pequeñas vesículas cercanas a los zincosomas (B) y, algunas de ellas se consiguieron fijar durante el proceso de fusión con los zincosomas (A y B) (zincosomas previamente vistos por fluorescencia en la figura 55). Mientras que otras vesículas, estaban en proceso de formación por invaginación de la membrana plasmática (C).

Por lo que concluimos que, los astrocitos tras el pulso de zinc exógeno formarían zincosomas que pueden ser visualizados con el fluorocromo TSQ. En el MET a mayores aumentos, podemos ver la correlación de los zincosomas entre el microscopio de fluorescencia y el electrónico como vesículas aparentemente vacías. Estos zincosomas se formarían por la fusión de vesículas más pequeñas que se generarían por invaginación en la membrana plasmática, donde capturarían el zinc extracelular aplicado durante el pulso, pero que debido a su pequeño tamaño, solo podrían ser localizados con el MET y no así mediante fluorescencia o campo claro.

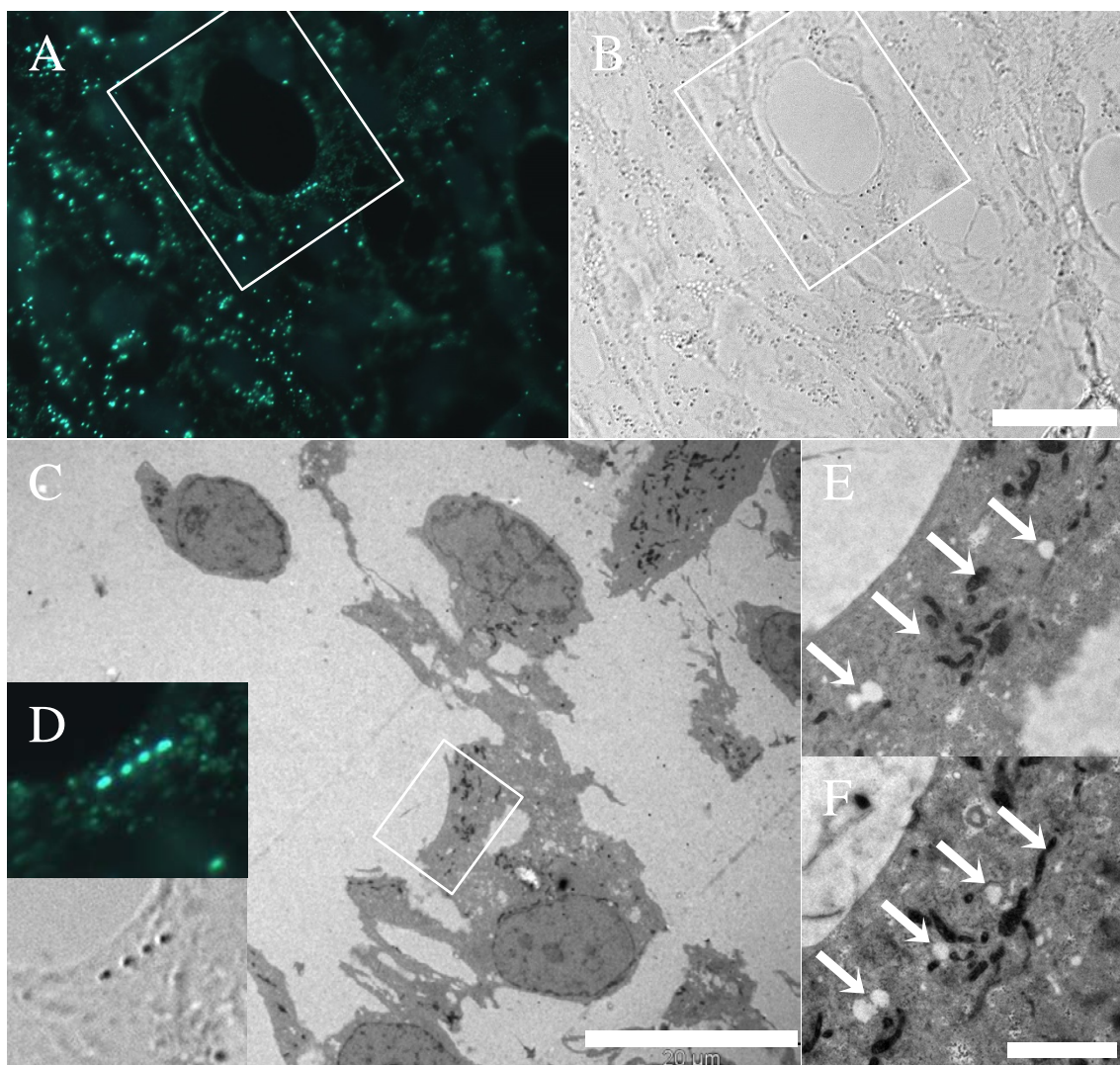


Figura 55. Caracterización de los zincosomas a nivel subcelular (I).

Imagen mostrando zincosomas marcados con TSQ en astrocitos en cultivo incubados previamente con zinc exógeno (A). En (B) se muestra una imagen de campo claro de la misma zona que (A), donde se puede observar como algunos zincosomas fluorescentes en (A) aparecen como puntos oscuros en (B). Vemos en (C) la zona homóloga a (A y B), seleccionada en un corte ultrafino (nº14) incluyendo la célula seleccionada con los cuatro zincosomas para ser estudiada a mayores aumentos. El recuadro en (C) corresponde a (E y F). En (D) se muestra una ampliación de (A y B), donde se incluyen los cuatro zincosomas analizados aquí con detalle. Las figuras (E y F) son un aumento de (C), (E) corresponde al ultrafino (nº15) y las flechas apuntan a la posición de los cuatro zincosomas marcados con TSQ de (D), en este caso aparecen dos zincosomas solamente, siendo el inferior doble. Y en (F), corresponde al ultrafino (nº16), aquí tres de los cuatro zincosomas están presentes, además nuevamente se observa como el zincosoma inferior es doble, lo que puede apreciarse en (D) con fluorescencia, marcado con TSQ, y con campo claro. Escalas: figuras A, B y C = 20 μm ; figuras E y F = 2 μm .

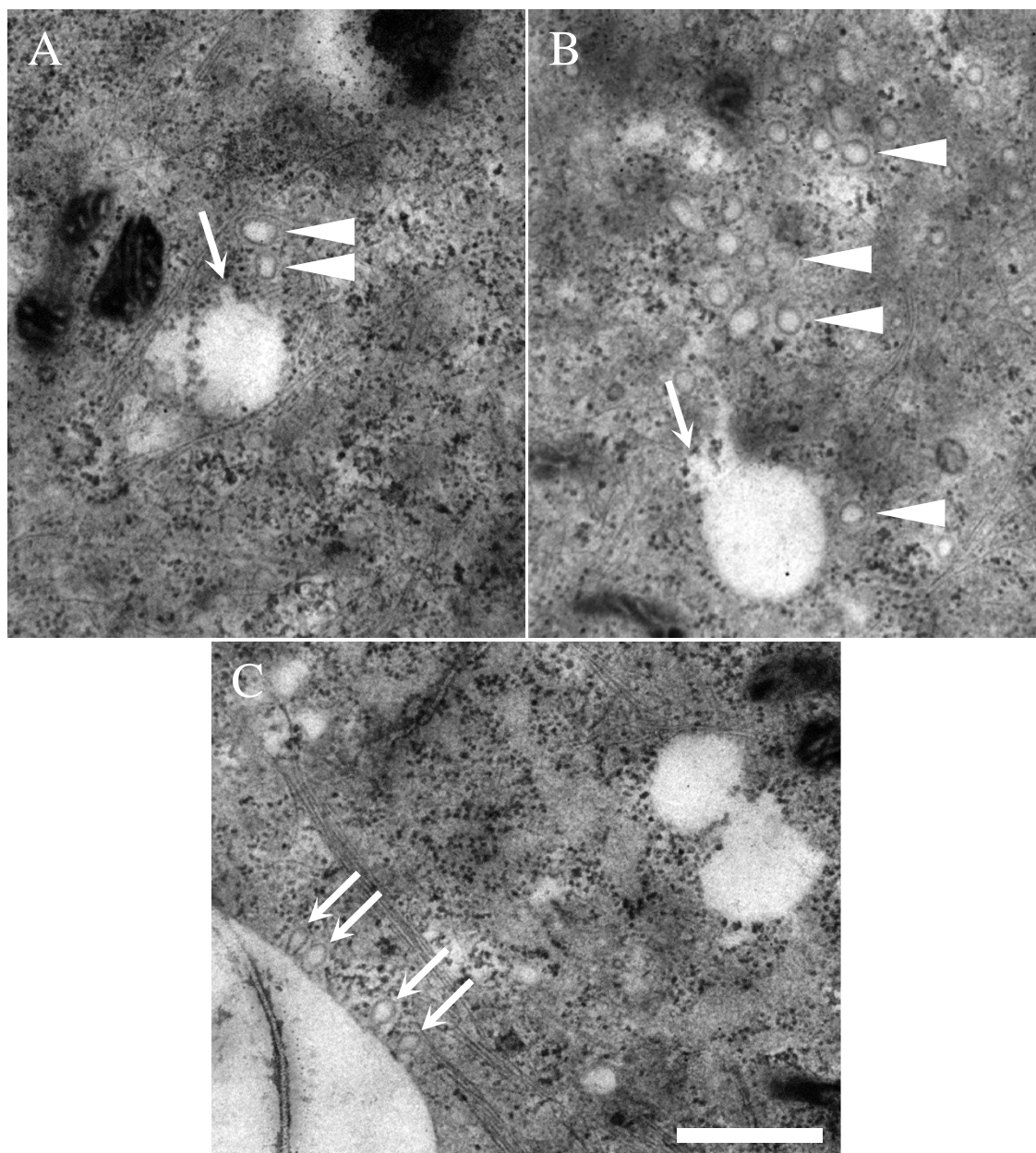


Figura 56. Caracterización de los zincosomas a nivel subcelular (II).

Imagen mostrando un zincosoma en el ultrafino (nº17) con una vesícula (flecha) y un par de vesículas de endocitosis cerca de ella (puntas de flecha) (A). En (B) vemos el mismo zincosoma en el ultrafino (nº19) mostrando la fusión de una vesícula (flecha) y alrededor, muchas vesículas de endocitosis (puntas de flecha). En (C) tenemos el zincosoma doble en el ultrafino (nº16) junto con numerosas vesículas de endocitosis en formación en la membrana plasmática (flechas). Escalas: figuras A, B y C = 0,5 μm .

4.2 Caracterización ultraestructural de los zincosomas marcados con ditizona.

Con el objetivo de caracterizar la ultraestructura de los zincosomas mediante microscopía electrónica, se utilizó la tinción con ditizona en las células vivas y un marcaje estándar de los zincosomas con TSQ. Posteriormente se llevó a cabo la correlación entre la tinción con ditizona y la MET. Para ello se utilizaron astrocitos en cultivo primario, los cuales se incubaron previamente con TPEN, se les dio un pulso de 50 μM ZnSO_4 de 10 minutos, a continuación se marcaron de forma simultánea con el fluorocromo TSQ y la ditizona. Como se puede ver en la figura 57, los astrocitos mostraron un claro marcaje de los zincosomas por todo el citosol, tanto con la tinción con ditizona (A), como con el marcaje fluorescente de TSQ (B), viéndose como coincidentes todos los zincosomas encontrados con ambos marcadores (C).

Paralelamente, otras monocapas fueron incubadas con zinc y ditizona para marcar el zinc iónico. Fueron observadas brevemente con el microscopio de campo claro para comprobar el correcto marcaje de los zincosomas y fotografiados para su seguimiento y correlación al MET. Los astrocitos se fijaron inmediatamente con PFA tras tomar las fotografías. Tras la inclusión en resina TAAB, las células previamente identificadas y localizadas en campo claro (D) fueron cortadas en series de cortes ultrafinos (F-I). Los zincosomas marcados anteriormente con ditizona (E) se localizaron con microscopía electrónica como vesículas aparentemente vacías (F-H), siendo a más aumentos con el MET (I) donde se puede apreciar más claramente una distribución idéntica a la encontrada con el marcaje con ditizona (E).

Por lo que concluimos que, los astrocitos tras el pulso de zinc exógeno forman zincosomas que pueden ser visualizados con el marcador ditizona, pudiéndose visualizar claramente en campo claro. Podemos ver como esta marca obtenida con la ditizona es la misma que la obtenida con el fluorocromo TSQ en las células vivas. Y finalmente, en el MET a mayores aumentos, podemos ver la existencia de una correlación entre el microscopio de campo claro y el electrónico donde vemos los zincosomas como vesículas aparentemente vacías coincidentes.

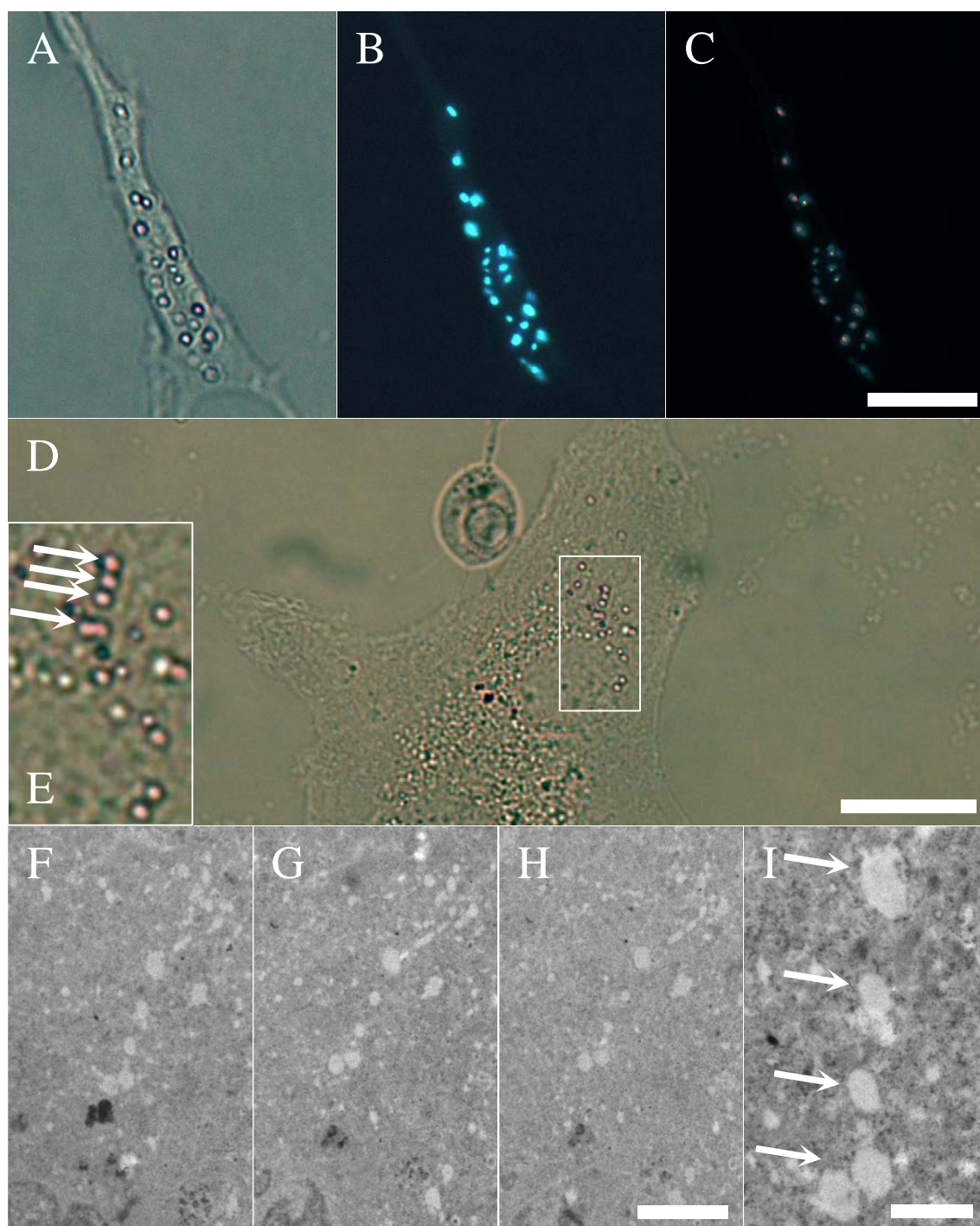


Figura 57. Caracterización subcelular de los zincosomas tras el marcaje con ditizona.

Imagen representativa mostrando zincosomas marcados de color rojo con ditizona en astrocitos en cultivo incubados previamente con zinc exógeno (A). En (B) se muestran zincosomas brillantes con TSQ de la misma zona que (A). En (C) se muestra la coincidencia de la marca de ditizona y de TSQ en los mismos zincosomas. En (D) se muestra otra célula incubada con zinc y ditizona que presenta numerosos zincosomas marcados en rojo, y donde (E) es una ampliación de (D), que incluye los cinco zincosomas analizados con detalle. F-H son cortes ultrafinos seriados (n°8-10) de (D), incluyendo los zincosomas de la célula seleccionada. En (I) se muestra el ultrafino (n°11) y las flechas señalan a los cinco zincosomas marcados con ditizona y señalados en (E). Escalas: figuras A, B, C y D = 20 μm ; figuras F, G y H = 3 μm ; figura I = 1 μm .

4.3 Detección de zinc a nivel ultraestructural.

Con el objetivo de localizar a nivel ultraestructural el contenido de zinc iónico de los zincosomas mediante microscopía electrónica, se utilizaron astrocitos en cultivo primario. Las células se incubaron previamente con TPEN, se les dio un pulso de zinc, se fijaron con PFA y a continuación, se precipitó el zinc iónico mediante la incubación de las monocapas en NTS. Tras la inclusión en resina TAAB, las muestras fueron cortadas en series de cortes semifinos. Algunas series de cortes semifinos se revelaron con Neo-Timm, y se contrastaron con azul de toluidina. Estos cortes semifinos revelados fueron observados y fotografiados con el microscopio de campo claro para ratificar que se había obtenido un precipitado de plata correcto y sin artefactos. A continuación se eligieron los cortes que presentaban una marca más clara y se reincluyeron para ultramicrotomía, descartándose los cortes ultrafinos más superficiales, es decir, los más cercanos a la cara del semifino que estuvo en contacto con el revelador, porque la muestra estaba degradada por la acción del pH, y el resto de cortes se observaron al MET.

En la figura 58, vemos dos cortes semifinos tras la tinción con azul de toluidina y el revelado autometalográfico (A y B). A continuación, podemos ver como los astrocitos presentaban zincosomas marcados con plata metálica propia del revelado de Neo-Timm (C) y la misma estructura celular en otro corte ultrafino, mostraban un precipitado electrodenso (D) propio del método sulfhídrico-osmio (López-García *et al.*, 1984). Otros zincosomas, presentaron marca de plata de Neo-Timm (E) y la misma estructura en cortes adyacentes, mostraban el doble marcaje, precipitados de plata metálica del revelado autometalográfico y precipitados de zinc electrodensos del sulfhídrico-osmio (F).

Por lo que concluimos que, podemos detectar y visualizar el zinc iónico contenido en los zincosomas de los astrocitos tras el pulso de zinc exógeno a nivel ultraestructural con el MET. Demostrando que, los zincosomas visualizados el microscopio de fluorescencia y que anteriormente al MET se veían como estructuras vesículas aparentemente vacías, contienen zinc, como se ha demostrado tanto con el precipitado de plata del revelado autometalográfico de Neo-Timm, como con el precipitado de zinc del sulfhídrico-osmio.

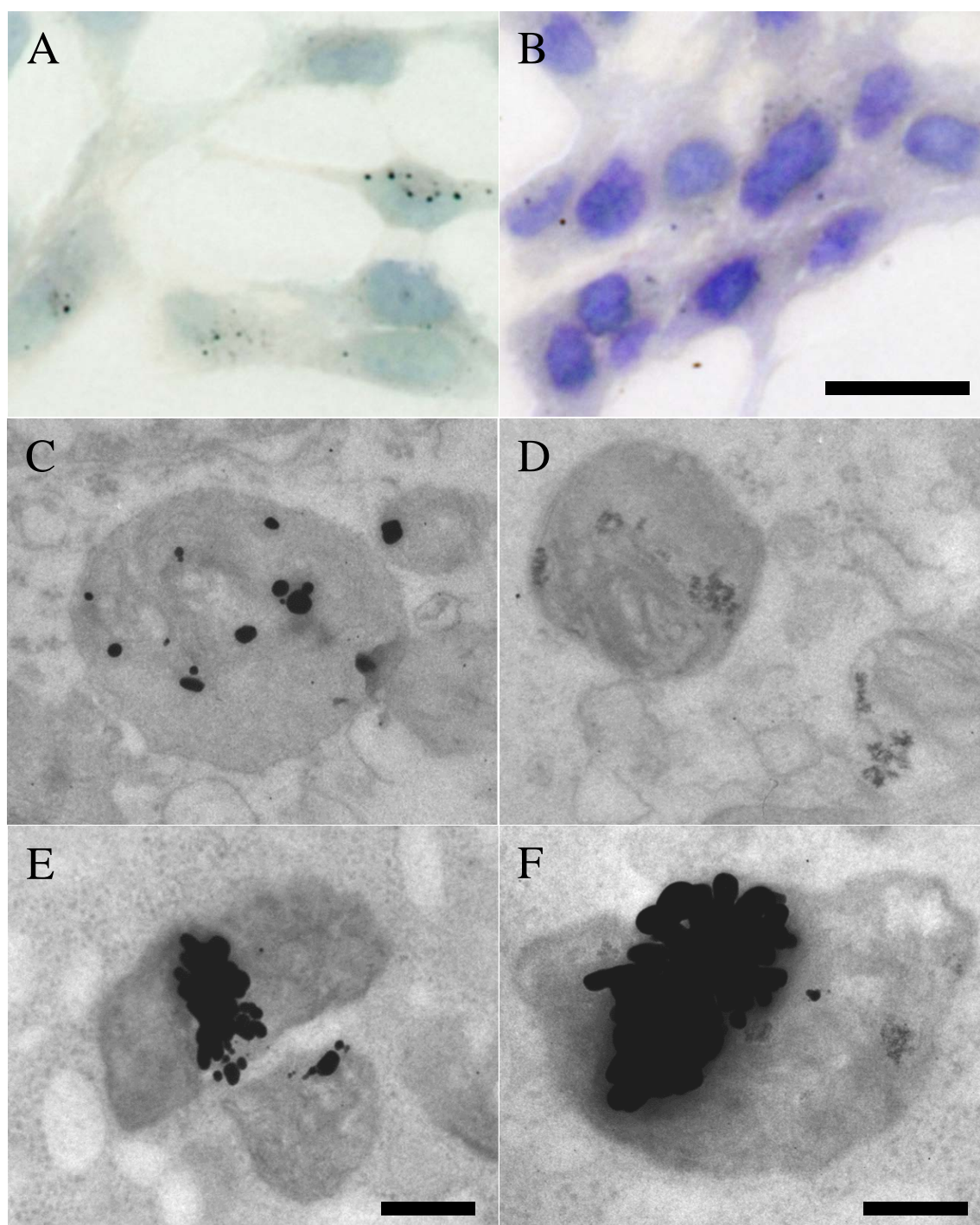


Figura 58. Colocalización de marcajes de zinc en zincosomas al MET.

Imagen representativa mostrando dos cortes semifinos tras el revelado autometalográfico (A y B), a partir de los cuales se obtuvieron los cortes ultrafinos para el estudio ultraestructural de los zincosomas. En (C) tenemos un zincosoma marcado con precipitado de plata del revelado de Neo-Timm en el ultrafino (nº8). En (D) aparece el mismo zincosoma marcado con el método del sulfhídrico-osmio en el ultrafino (nº12). En (E y F) se puede ver el mismo zincosoma que, en un corte ultrafino (nº9) posee el precipitado de plata tras el revelado (E), y en el ultrafino (nº14) presenta la doble marca, tanto el precipitado de plata del revelado, como precipitado de zinc del método sulfhídrico-osmio (F). Escalas: figuras A y B = 20 μm ; figuras C, D y E = 0,1 μm ; figura F = 0,2 μm .

5. EFECTOS DEL MODELO DE SAF EN LA HOMEOSTASIS DEL ZINC.

5.1 El contenido de zinc iónico basal y capturado en cultivos de astrocitos tratados con etanol.

Con la finalidad de determinar y comparar los valores de fluorescencia basales entre los astrocitos control y los tratados con etanol, se utilizaron monocapas de astrocitos en cultivo primario obtenidos a partir de ratas Wistar recién nacidas y se hicieron crecer en medio completo y otras en medio completo con 30 mM de etanol. Los astrocitos se incubaron con el marcador fluorescente TSQ y se tomaron fotos para evaluar los niveles de zinc basales. Vimos que la distribución de la fluorescencia no era siempre uniforme, ya que pudimos observar células con diferentes intensidades de fluorescencia en el mismo campo. Por este motivo, hubo que hacer diversos muestreos. Como se puede ver en la figura 59, el nivel de fluorescencia basal de los astrocitos controles (A) es mayor que el de los astrocitos tratados con etanol (C).

Paralelamente, otras placas con astrocitos controles y tratados con etanol se incubaron con un pulso de zinc exógeno con el objetivo de determinar si había diferencias en el proceso de captación y gestión de zinc extracelular entre ambos tipos de astrocitos. Para ello, las monocapas se incubaron primeramente con TPEN durante 10 minutos, a continuación se incubaron los astrocitos con 50 μ M ZnSO₄ durante 10 minutos para marcarse con el fluorocromo TSQ durante 10 minutos y finalmente ser fotografiadas. En la figura 60, podemos observar como los niveles de fluorescencia de los astrocitos controles (A y C) eran mayores a los astrocitos tratados con etanol (B y D) tras el pulso de zinc exógeno, tanto a bajos aumentos (A y B) como a mayores aumentos (C y D), de forma similar a lo que sucedía con el zinc basal.

Tras cuantificarse los valores de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 61A), podemos apreciar como los astrocitos tratados con etanol tienen un nivel de fluorescencia basal un 72% inferior respecto a los astrocitos controles (*t* de Student, $p < 0,01$), lo que refleja una reducción en la concentración de zinc citoplásmico. También se puede apreciar como los astrocitos tratados con etanol tienen un nivel de fluorescencia tras el pulso de zinc exógeno un 70% inferior a los astrocitos controles (*t* de Student, $p < 0,01$).

Podemos comprobar cómo tras el pulso de zinc exógeno, ambos cultivos de astrocitos reaccionan aumentando la cantidad de iones de zinc capturado desde el medio extracelular como reflejan los valores de fluorescencia, que aumentan un 30% en los astrocitos controles y un 35% los tratados con etanol tras el pulso respecto a los niveles basales. Estos incrementos fueron estadísticamente significativos en ambos casos (*t* de Student, $p < 0,01$).

Al mismo tiempo se cuantificó la densidad de zincosomas presentes en los cultivos tras los tratamientos (figura 61B), dando como resultado un marcaje claro de los zincosomas tras el pulso de zinc, ya que sin éste no obtuvimos ningún tipo de marca. La densidad de zincosomas tras pulso de zinc exógeno era un 74% mayor en los astrocitos controles respecto a los tratados (t de Student, $p < 0,01$).

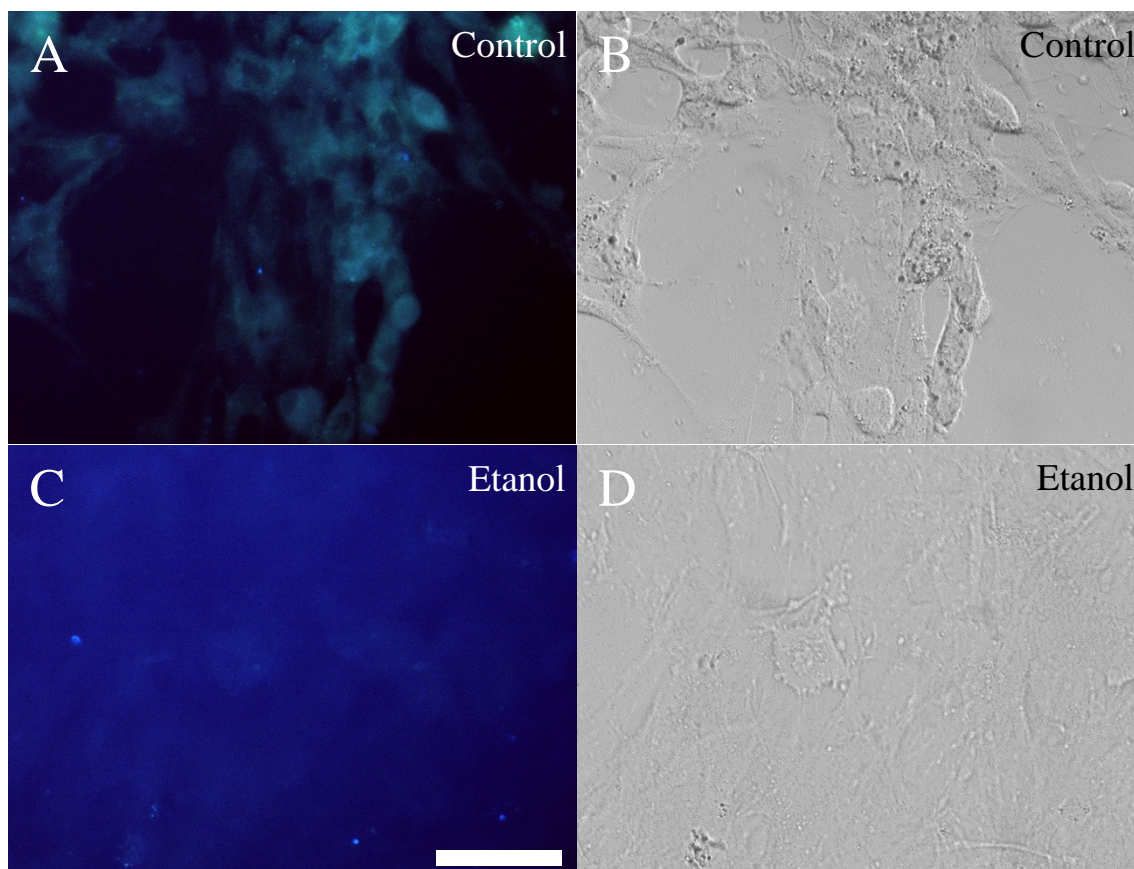


Figura 59. Efecto del etanol sobre los niveles basales de zinc.

Imagen representativa mostrando astrocitos en cultivo, que se dividieron en dos grupos, controles (A y B) y tratados con 30 mM de etanol (C y D). La fluorescencia del TSQ en las células, fue mayor en los controles (A) en comparación con las células tratadas con etanol (C). Las monocapas de células no presentaron ninguna diferencia morfológica notable observable entre los controles (B) y las tratadas con etanol (D). Escala: 40 μ m.

Vemos como ambos cultivos de astrocitos reaccionan aumentando la densidad de zincosomas presentes en el citosol, siendo el incremento de los controles significativamente mayor respecto a los tratados con etanol.

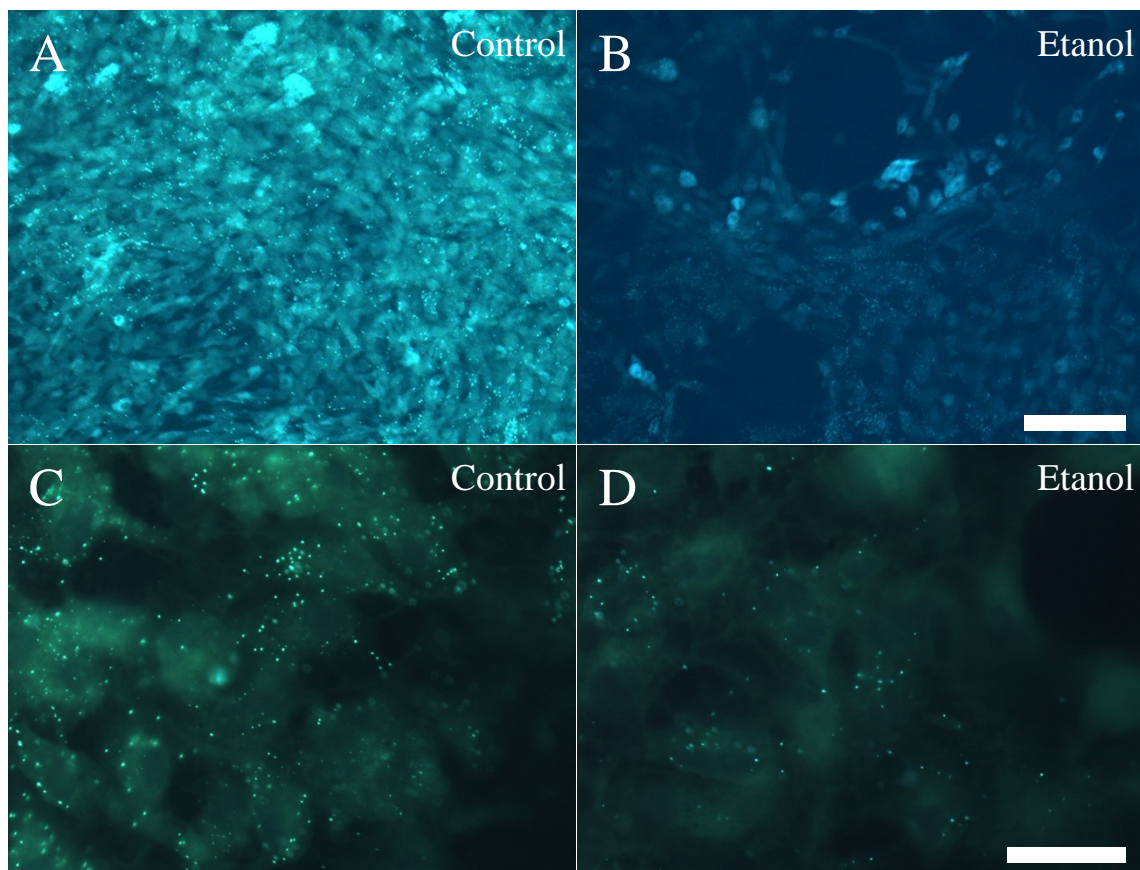


Figura 60. Efecto del etanol sobre la captación de zinc en astrocitos.

Imagen representativa mostrando astrocitos incubados durante 10 minutos con 50 μM ZnSO₄ y posteriormente con TSQ. A pocos aumentos (A y B), los astrocitos controles (A) mostraron unos niveles de fluorescencia mayores que las células tratadas con etanol (B). A mayores aumentos (C y D), los astrocitos controles (C) mostraron una mayor densidad de zincosomas brillantes que las células tratadas con etanol (D). Escalas: figuras A y B = 150 μm; figuras C y D = 30 μm.

Por lo que concluimos que los astrocitos controles poseen unos mayores valores basales de zinc y capturado tras el pulso de zinc exógeno que los astrocitos tratados con etanol, pese a que ambos parecen reaccionar de forma similar durante la captación de zinc extracelular. Se muestra por lo tanto que, tanto el tratamiento con etanol de los astrocitos, como la incubación con zinc, inducen diferencias significativas en la cantidad de zinc intracelular de los astrocitos, tanto por la incubación con etanol como por el pulso de zinc exógeno ($p < 0,001$). Y respecto a la densidad de zincosomas sucede algo similar, tanto los astrocitos controles como tratados no presentan zincosomas marcados en condiciones basales, pero tras el pulso de zinc exógeno vemos como los astrocitos tratados poseen una menor densidad, por lo que la incubación con zinc induce diferencias en la densidad de zincosomas en los astrocitos ($p < 0,01$ por el pulso de zinc).

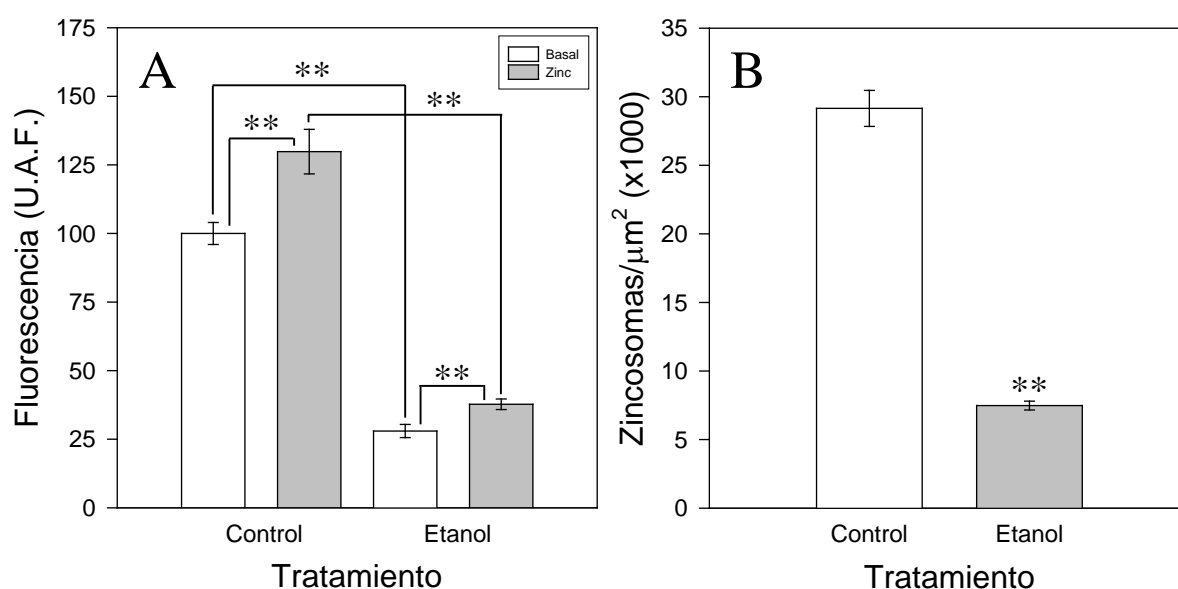


Figura 61. Niveles de zinc basales y capturado medidos con fluorescencia de TSQ.

Gráfico mostrando como, los niveles basales de zinc en los astrocitos tratados con etanol son significativamente inferiores que en los controles (A). Lo mismo sucede con los niveles de zinc capturado tras el pulso, en el cual ambos tratamientos aumentan respecto a los valores basales, pero este aumento en los tratados con etanol es semejante al de los controles. En (B) se muestra la densidad de zincosomas entre los astrocitos controles y los tratados con etanol, siendo la de los tratados significativamente inferior respecto a la de los controles. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, $n = 60$ monocapas y 84 células).

5.2 La densidad y distribución de zincosomas en cultivos de astrocitos tratados con etanol.

Con el objetivo de estudiar la densidad y distribución de los astrocitos controles y tratados con etanol, se utilizaron monocapas de astrocitos en cultivo primario y se hicieron crecer sobre cubreobjetos incubados en medio completo y otros en medio completo con 30 mM de etanol. Los astrocitos se incubaron primero con TPEN durante 10 minutos, a continuación se incubaron con 50 μ M ZnSO₄ durante 10 minutos, se marcaron con el fluorocromo TSQ durante 10 minutos y finalmente se tomaron fotos para medir la densidad de zincosomas en ambos tratamientos. Ya habíamos visto que la distribución de la fluorescencia no era siempre uniforme (apartado 5.1), pero tras diversos muestreos y capturas a grandes aumentos obtuvimos imágenes representativas y cuantificables para ambos tratamientos. Como se puede ver en la figura 62, la densidad de zincosomas en los astrocitos tratados con etanol (B) era menor que los astrocitos controles (A), además de tener una menor densidad, su distribución era menos homogénea. Para analizar mejor estas diferencias, se clasificaron en dos grupos atendiendo a su tamaño: grandes (más brillantes, ubicados cerca del núcleo) y pequeños (menos brillantes, ubicados cerca de la membrana plasmática).

Tras cuantificar la densidad de zincosomas presentes en los cultivos tras los tratamientos (figura 63), obtuvimos una reducción en la densidad de zincosomas totales de un 70% en los astrocitos tratados con etanol respecto a los controles (*t* de Student; $p < 0,001$) (valores similar obtenidos en el apartado 5.1). Esta disminución era principalmente debida a una disminución en la densidad de zincosomas de pequeño tamaño de entorno al 73% (*t* de Student; $p < 0,001$), mientras que los zincosomas de mayor tamaño aumentaron su densidad en un 50% tras el tratamiento con etanol (*t* de Student; $p < 0,05$). Al analizar los resultados para cada tipo de incubación resultó que, con el tratamiento con etanol el porcentaje de zincosomas pequeños respecto de los totales disminuye de un 97% a un 84%, mientras que los de mayor tamaño aumentan de un 3% a un 16% en la proporción de zincosomas de mayor tamaño tras el tratamiento con etanol.

Por lo que concluimos que los astrocitos tratados con etanol poseen una menor densidad de zincosomas totales respecto a los controles, pero esta reducción no es semejante para todos los tamaños, sino que lo hace disminuyendo principalmente el número de zincosomas pequeños, localizados generalmente en la periferia de las células. Y por el contrario, aumentando la densidad de zincosomas grandes, localizados en su mayoría cerca del núcleo.

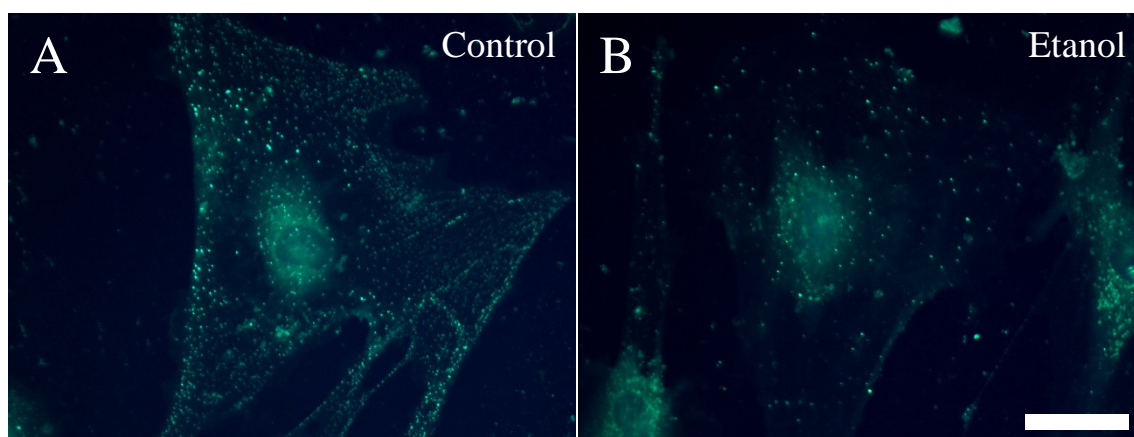


Figura 62. Efecto del etanol sobre la densidad y distribución de los zincosomas (I).

Imagen representativa mostrando astrocitos incubados con un pulso de zinc exógeno y a continuación se marcados con el fluorocromo TSQ. En (A) los astrocitos controles muestran una mayor densidad de zincosomas y una distribución homogénea de estos por todo el citosol. En (B) los astrocitos tratados con etanol muestran una reducción significativa en el número de zincosomas marcados, siendo más notable la reducción de zincosomas pequeños y más cercanos a la membrana plasmática.

Escala: 40 μm .

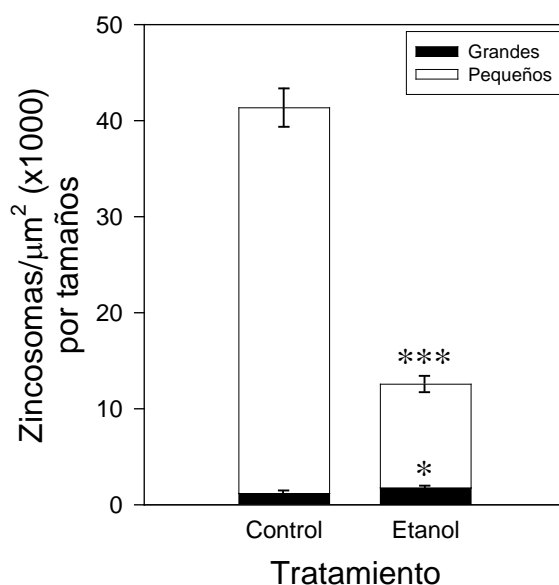


Figura 63. Efecto del etanol sobre la densidad y distribución de los zincosomas (II).

Gráfico mostrando la densidad de zincosomas y la proporción de zincosomas pequeños y grandes según los distintos tratamientos. Podemos ver cómo además de la disminución del 70% del número total de zincosomas en los astrocitos tratados con etanol, esta disminución es debida principalmente a la reducción del número de zincosomas pequeños, siendo un 84% en los tratados y del 97% de los controles respecto del total. Por otra parte, es el número de zincosomas de gran tamaño los que aumentan en un 50% en los astrocitos tratados con etanol respecto de los controles. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, * $p < 0,05$ referido al estudio de zincosomas grandes; *** $p < 0,001$ referido al estudio de zincosomas pequeños y al total de zincosomas, $n = 64$ células).

5.3 La densidad de zincosomas con distintos tiempos de incubación con zinc en cultivos de astrocitos tratados con etanol.

Con el objetivo de determinar si el etanol afectaba la densidad de zincosomas formados tras distintos tiempo de incubación con zinc en los astrocitos control y tratados, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos que se hicieron crecer en medio completo y en medio completo suplementado con 30 mM de etanol. Los astrocitos se incubaron primeramente con TPEN durante 10 minutos, a continuación se incubaron con 50 μ M ZnSO₄ durante tiempos comprendidos entre 10 segundos y 10 minutos. Se marcaron las células con el fluorocromo TSQ durante 10 minutos y finalmente fueron fotografiadas. Como se puede ver en la figura 64, donde se muestran los niveles de fluorescencia del soma y la densidad de zincosomas con TSQ, ambos cultivos no presentaban ningún tipo de marca fluorescente sin el pulso de zinc exógeno (A y B). Se pueden apreciar zincosomas ya desde los 10 segundos de incubación con zinc, tanto en astrocitos controles como en tratados con etanol (C y D) y esta marca fluorescente en forma de zincosomas va aumentando conforme aumentan los tiempos de incubación con zinc, sin diferencias apreciables entre ambos tratamientos (C-H). Pero es con el tiempo de incubación más largo, 10 minutos (I y J), donde encontramos que los astrocitos controles poseen una densidad mayor de zincosomas en el citosol en comparación con los tratados con etanol.

Tras cuantificarse la densidad de zincosomas presentes en los cultivos de cada uno de los tratamientos (figura 65), podemos comprobar cómo tras el pulso de zinc exógeno a distintos tiempos, ambos cultivos de astrocitos reaccionan aumentando la cantidad de iones de zinc capturado del medio extracelular. La densidad de zincosomas en ambos tratamientos es muy similar en los tiempos cortos de incubación, pero es en el tiempo de incubación de 10 minutos donde encontramos diferencias significativas, siendo la densidad de zincosomas en astrocitos controles un 27% mayor que en los tratados con etanol (*t* de Student, $p < 0,01$).

Por lo que concluimos que tras distintos tiempos de incubación con zinc exógeno, ambos cultivos de astrocitos reaccionan aumentando la densidad de zincosomas presentes en el citosol, encontrando diferencias significativamente mayores en los controles respecto a los tratados con etanol solamente en el tiempo de 10 minutos.

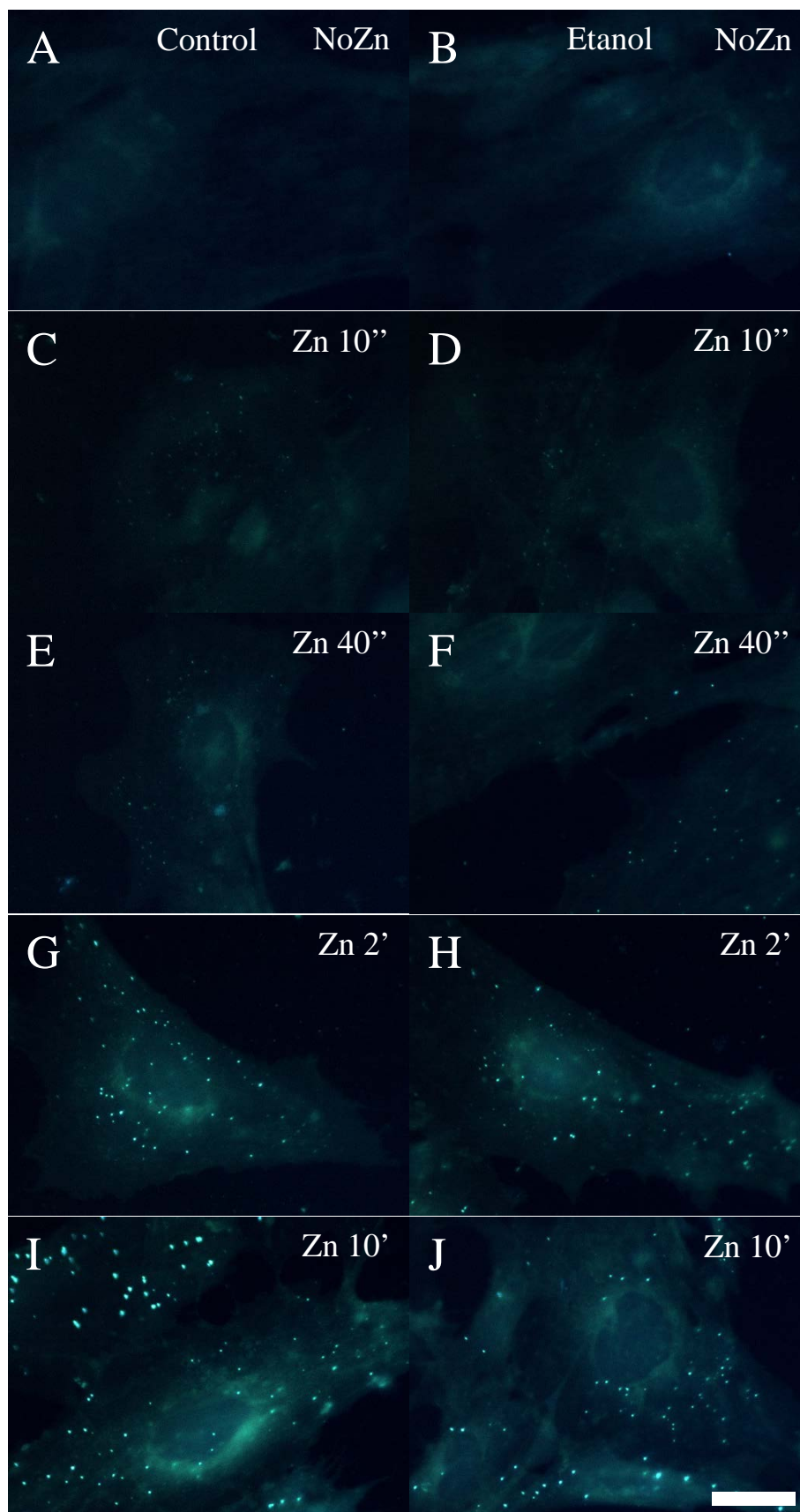


Figura 64. Efectos del etanol sobre la captación de zinc a distintos tiempo de incubación (I).

Imagen representativa mostrando como, los astrocitos sin pulso de zinc no poseen zincosomas (A y B) y como desde tiempos cortos de incubación como 10 segundos ya se empiezan a ver algunos zincosomas fluorescentes (C y D). Con tiempos de 40 segundos y 2 minutos (E-H), se ven más zincosomas brillantes pero con pocas diferencias entre las monocapas control y las tratadas con etanol. Con el tiempo de incubación más largo, de 10 minutos (I-J), se puede apreciar como las muestras tratadas con etanol muestran una menor densidad de zincosomas en comparación con las controles. Escala: 30 μm .

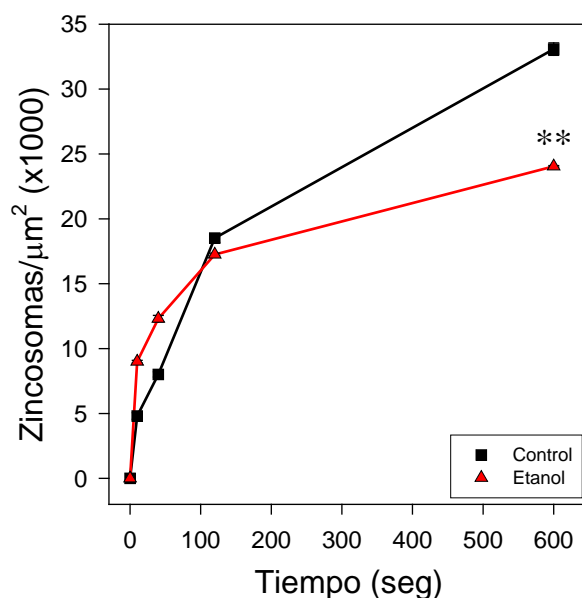
**Figura 65. Efectos del etanol sobre la captación de zinc a distintos tiempo de incubación (II).**

Gráfico mostrando la diferencia en la densidad de zincosomas entre astrocitos control y tratados con etanol tras la incubación de estos con distintos tiempos de zinc exógeno. Podemos observar cómo, en los primeros tiempos analizados 10, 40 y 120 segundos, la densidad de zincosomas entre ambos tratamientos es casi idéntica, pero en el tiempo de incubación con zinc más largo, los astrocitos mostraron una densidad de zincosomas significativamente menor en las muestras tratadas con etanol respecto de los controles. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student, ** $p < 0,01$, $n = 300$ células).

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

6. EFECTOS DEL MODELO DE SD EN LA HOMEOSTASIS DEL ZINC.

6.1 El contenido de zinc iónico basal y capturado en cultivos de astrocitos Ts65Dn.

Con el objetivo de determinar y comparar cuáles eran los valores de fluorescencia basales entre los astrocitos Ts65Dn y sus equivalentes controles, se utilizaron monocapas de astrocitos en cultivo primario obtenidos a partir de ratones recién nacidos Ts65Dn y utilizando a sus hermanos de camada euploides como controles. Éstos se incubaron con el marcador fluorescente TSQ y se tomaron fotos para evaluar los niveles de zinc basales. Como se puede ver en la figura 68, el nivel de fluorescencia basal de los astrocitos controles (A) es mayor que el de los astrocitos Ts65Dn (B) además, los astrocitos Ts65Dn presentan zincosomas bien marcados por el citosol, lo que no ocurre con los controles.

Paralelamente, otras placas con astrocitos controles y Ts65Dn se incubaron con un pulso de zinc exógeno con el objetivo de determinar si había diferencias en la captación de zinc extracelular y para gestionar la absorción de zinc entre ambos tipos de astrocitos. Para ello, las monocapas se incubaron primeramente con TPEN durante 10 minutos, a continuación se incubaron los astrocitos con 50 μM ZnSO_4 durante 10 minutos para marcarse con el fluorocromo TSQ durante 10 minutos y finalmente ser fotografiadas. En la figura 68, podemos observar como nuevamente, los niveles de fluorescencia de los astrocitos controles (C) eran inferiores a los astrocitos Ts65Dn (D) tras el pulso de zinc exógeno.

Tras cuantificarse los valores de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 69), podemos apreciar como los astrocitos Ts65Dn tienen un nivel de fluorescencia basal un 20% inferior respecto a los astrocitos controles (t de Student, $p < 0,001$), lo que refleja una reducción proporcional en la concentración de zinc libre. También se puede apreciar como los astrocitos Ts65Dn tienen un nivel de fluorescencia tras el pulso de zinc exógeno un 22% inferior a los astrocitos controles (t de Student, $p < 0,001$).

Podemos comprobar cómo tras el pulso de zinc exógeno, ambos cultivos de astrocitos incrementan su concentración de zinc a partir del zinc capturado desde el medio extracelular como reflejan los valores de fluorescencia, que aumentan un 18% en los astrocitos controles y un 16% los Ts65Dn tras el pulso respecto a los niveles basales. Estos incrementos fueron estadísticamente significativos en ambos casos ($p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente).

Al mismo tiempo se cuantificó la densidad de zincosomas presentes en los cultivos tras los tratamientos, dando como resultado un aumento en la densidad de zincosomas/astrocito tras el pulso de zinc (figura 70). La densidad de zincosomas en condiciones basales era 16 veces mayor en los astrocitos Ts65Dn respecto a los controles (t de Student, $p < 0,05$) siendo la presencia de zincosomas en los astrocitos controles en condiciones basales casi nula. Sin embargo, tras el pulso de zinc exógeno, se obtiene como resultado una densidad de un 32% mayor en los astrocitos Ts65Dn respecto a los controles, aunque sin ser la diferencia estadísticamente significativa (t de Student, $p = 0,36$).

Podemos comprobar cómo tras el pulso de zinc exógeno, ambos cultivos de astrocitos reaccionan aumentando la densidad de zincosomas/astrocito, incrementándose en 60 veces en los astrocitos controles y en casi 5 veces en los Ts65Dn tras la incubación con zinc respecto a las condiciones basales. Los aumentos observados en los dos tipos de astrocitos fueron estadísticamente significativos ($p < 0,001$).

Por lo que concluimos que los astrocitos controles poseen unas mayores concentraciones basales de zinc y capturado tras el pulso de zinc exógeno que los astrocitos Ts65Dn. No obstante, ambos mantienen una capacidad similar de captación de zinc extracelular. Se muestra por lo tanto que, tanto el genotipo de los astrocitos como la incubación con zinc, induce diferencias en la cantidad de zinc intracelular en los astrocitos ($p < 0,0001$ por genotipo y $p < 0,001$ por captación de zinc). Y respecto a la densidad de zincosomas sucede lo contrario, los astrocitos Ts65Dn poseen una mayor densidad tanto en condiciones basales como tras el pulso de zinc exógeno. Igualmente vemos como tanto el genotipo de los astrocitos como la incubación con zinc, induce diferencias en la densidad de zincosomas en los astrocitos ($p < 0,05$ por genotipo y $p < 0,001$ por captación de zinc).

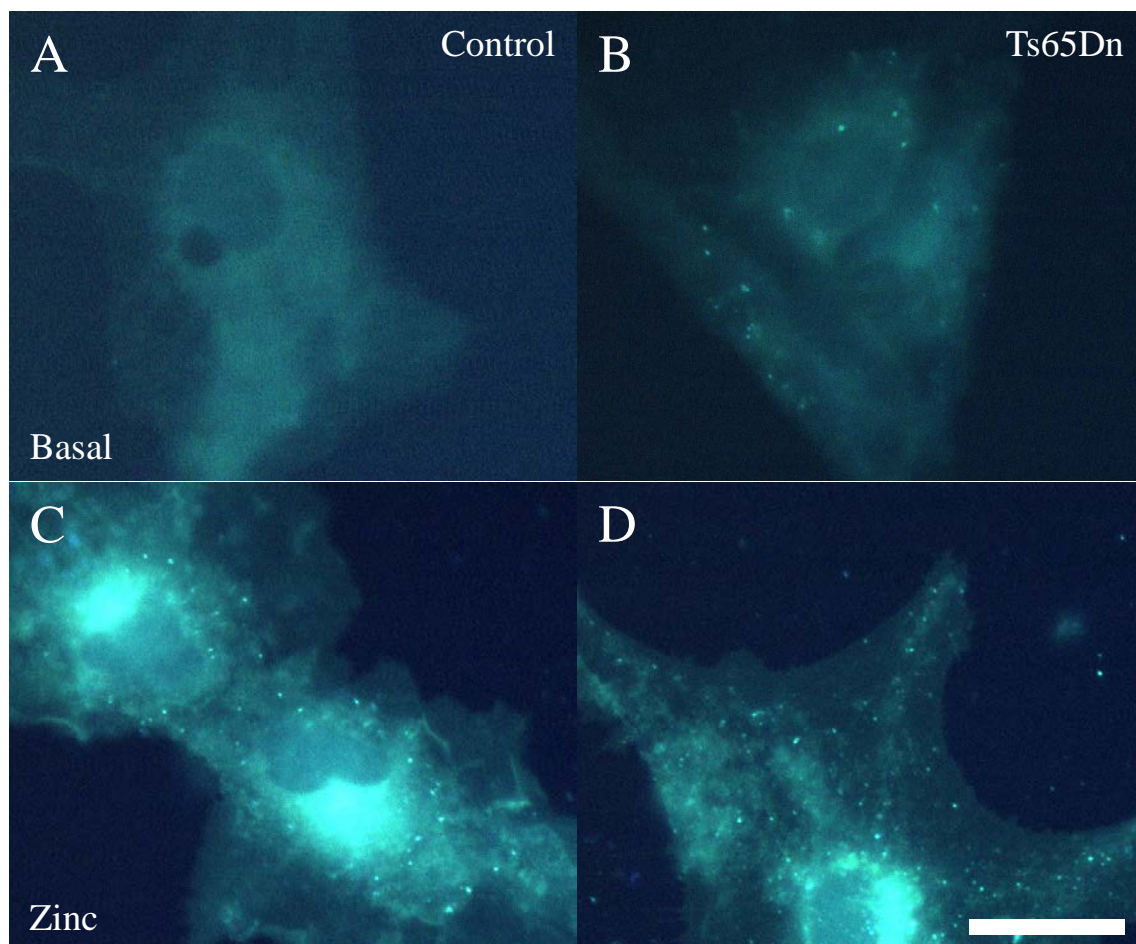


Figura 68. Zinc basal y capturado en astrocitos Ts65Dn (I).

Imagen representativa mostrando las diferencias entre los cultivos de astrocitos marcados con TSQ de controles (A y C) y de los ratones Ts65Dn (B y D), en condiciones basales (A y B) o tras de la carga de zinc exógeno (C y D). Observamos como los astrocitos controles tienen un nivel de fluorescencia mayor que los Ts65Dn en ambos casos, basales y tras el pulso de zinc. Se observa la presencia de zincosomas en los astrocitos trisómicos en condiciones basales (B). Escala: 20 μ m.

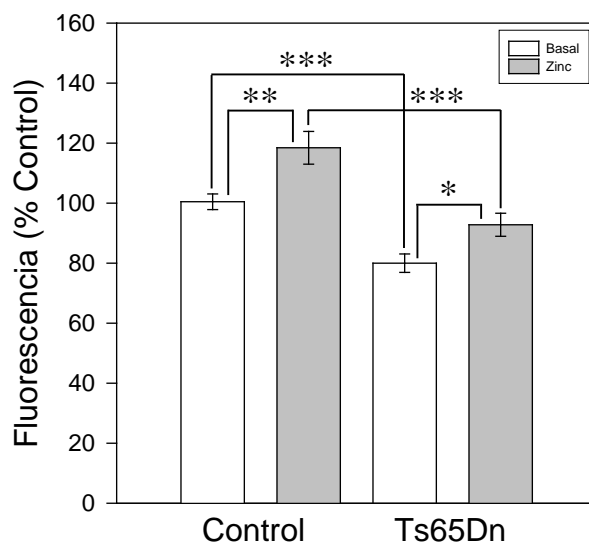


Figura 69. Zinc basal y capturado en astrocitos Ts65Dn (II).

Gráfico mostrando los niveles de emisión de fluorescencia con el fluorocromo TSQ, tanto en condiciones basales (barras blancas) como después de la carga de zinc exógeno (barras grises) en cultivo de astrocitos controles y Ts65Dn. En ambos grupos aumentan los niveles tras el pulso de zinc aunque los valores de los astrocitos Ts65Dn son menores en los dos ensayos. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, n = 214 células).

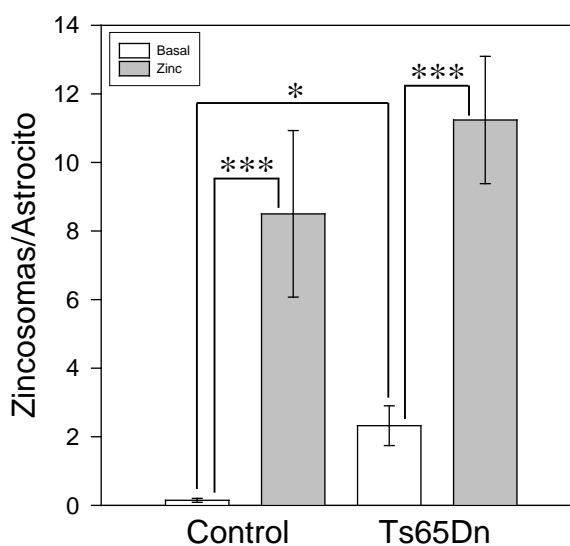


Figura 70. Densidad de zincosomas en astrocitos Ts65Dn.

Gráfico mostrando la densidad de zincosomas, tanto en condiciones basales (barras blancas) como después de la carga de zinc exógeno (barras grises) en cultivo de astrocitos controles y Ts65Dn. Encontramos un aumento significativo en ambos grupos tras la carga de zinc exógeno, siendo mayor la densidad final en los Ts65Dn. Nótese la gran diferencia en la densidad de zincosomas en condiciones basales. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, * p < 0,05; *** p < 0,001, n = 202 células).

6.2 Función endocítica y expresión de MT-3 en cultivos de astrocitos Ts65Dn.

Como hemos visto anteriormente en el apartado 1.6 con la colocación de los marcadores TSQ y FM1-43, la captación de iones zinc puede seguir un proceso de endocitosis. Con el objetivo de determinar si la función endocítica estaba alterada en los astrocitos Ts65Dn, se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de ratones Ts65Dn y utilizamos como controles a sus hermanos euploides. Las células se incubaron con el marcador fluorescente de endosomas tempranos FM1-43 durante 10 minutos y se tomaron capturas a 10 y 20 minutos.

Tras cuantificarse los valores de emisión relativa de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 71), y con respecto al nivel basal observado tras la incubación de los controles (100%), podemos apreciar como en ambos grupos de astrocitos muestran unos niveles de fluorescencia similares a los 10 minutos tras la captura de FM1-43 (t de Student, $p = 0,119$). Esto indica que fueron capaces de movilizarlo/captarlo de forma similar. Tras 10 minutos adicionales de incubación con medio base, observamos como en ambos grupos los niveles de fluorescencia de FM1-43 se ven reducidos de forma similar y significativa, en un 42% en los controles y en un 38% en los trisómicos (t de Student, $p = 0,608$).

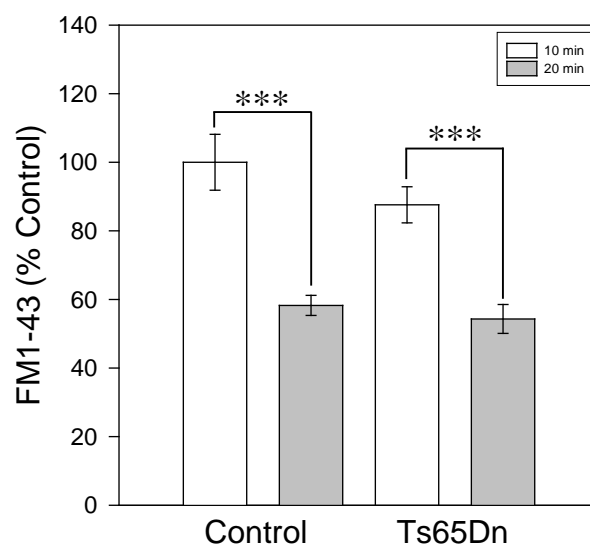


Figura 71. Función endocítica en astrocitos Ts65Dn.

Gráfico mostrando los niveles de emisión de fluorescencia con el marcador FM1-43 a distintos tiempos de incubación (10 minutos, barras blancas; 20 minutos, barras grises) en cultivo de astrocitos controles y Ts65Dn. En ambos grupos disminuyen los niveles tras el procesado aunque no hay diferencias entre genotipos. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, *** $p < 0,001$, $n = 96$ células).

Por lo que concluimos que, los astrocitos controles y los astrocitos Ts65Dn presentan un tráfico intracelular semejante, representado mediante una capacidad similar para movilizar/capturar el FM1-43. Globalmente los datos revelan que existe un efecto del tiempo después de la carga de FM1-43, pero no por el genotipo, por lo que podemos concluir que, en los astrocitos de ratones Ts65Dn, la función endocítica se mantiene inalterada.

En estudios anteriores se ha demostrado la existencia de una sobreexpresión de la metalotioneína 3 en otros tipos celulares con SD (Arai *et al.*, 1997), dicha molécula participa en la homeostasis del zinc. Dadas las diferencias a nivel basal observadas, se decidió analizar la expresión de MT-3 en los astrocitos Ts65Dn. Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos de ratones Ts65Dn y se utilizaron sus hermanos euploides como controles. Las células se procesaron según el protocolo general de inmunocitoquímica descrito anteriormente, utilizando el anticuerpo primario para la proteína MT-3 y posteriormente un anticuerpo secundario fluorescente. Finalmente se tomaron capturas para analizar su expresión mediante fluorescencia.

Tras cuantificarse los valores de emisión relativa de fluorescencia de cada uno de los genotipos (figura 72), se observa como los astrocitos Ts65Dn muestran una clara sobreexpresión de la MT-3 respecto a los astrocitos controles ($p < 0,01$).

Por lo que concluimos que los astrocitos Ts65Dn, poseen la metalotioneína 3 sobreexpresada un 20% respecto a la expresión de la MT-3 en los astrocitos control.

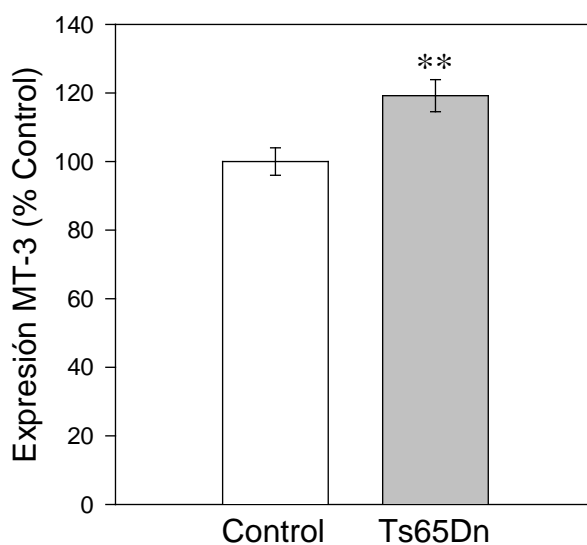


Figura 72. Expresión de MT-3 en astrocitos Ts65Dn.

Gráfico mostrando la expresión de MT-3 en el citosol de astrocitos controles y Ts65Dn. Podemos ver como los astrocitos de ratones trisómicos presentan una mayor expresión de la MT-3 respecto a los controles. Los asteriscos indican diferencias significativas (*t* de Student, ** $p < 0,01$, $n = 116$ células).

6.3 Silenciamiento génico de la proteína MT-3 en cultivos de astrocitos Ts65Dn.

Como hemos podido comprobar, los astrocitos Ts65Dn poseen una menor concentración citoplasmática de zinc tanto basal como capturado respecto a los astrocitos controles, además de poseer una mayor cantidad de la metalotioneína 3 (MT-3) en el citosol. Por lo que nos planteamos la cuestión de, si una reducción en la expresión de la MT-3 en cultivos de astrocitos utilizando un siARN para el gen *MT-3* podría conducir a un aumento en la concentración de iones zinc en el citosol.

Para generar una reducción en la expresión de la MT-3, se ha utilizado un procedimiento de silenciamiento génico mediante la transfección de shARN sobre los astrocitos en cultivo, en el cual como se ha descrito en el apartado 3, se usan dos plásmidos, uno con el siARN para la MT-3 y otro control.

Al finalizar el silenciamiento, se procedió a medir los niveles de zinc tanto basales como capturados tras el pulso de zinc exógeno utilizando el fluorocromo TSQ. Y en placas de cultivo paralelas, también se procedió a medir la expresión de la MT-3 por inmunocitoquímica.

En la figura 73, se puede apreciar que el nivel de fluorescencia basal medido con el TSQ de los astrocitos Ts65Dn controles (A) y los transfectados con el plásmido control (B), son inferiores a los astrocitos transfectados con el plásmido siARN para la MT-3 (C).

Tras cuantificarse los valores de emisión relativa de fluorescencia de cada uno de los tratamientos (figura 74), podemos apreciar como los astrocitos Ts65Dn con el plásmido siARN MT-3 tienen un nivel de fluorescencia citosólica basal un 40% mayor respecto a los astrocitos controles (t de Student, $p < 0,001$) y un 35% respecto a los niveles con el plásmido control (t de Student, $p < 0,001$), lo que refleja un aumento en la concentración de zinc libre en el citoplasma. Cuando a estos astrocitos se les aplica un pulso de zinc exógeno, se puede apreciar como los astrocitos Ts65Dn, tras el pulso, tienen un nivel de fluorescencia un 40% mayor respecto en los astrocitos basales en los controles (t de Student, $p < 0,001$) y un 22% respecto a los astrocitos basales con el plásmido control (t de Student, $p < 0,01$).

Podemos comprobar cómo consecuencia del silenciamiento génico, obtenemos unos niveles de fluorescencia mayores en condiciones basales, respecto a los dos controles. Y tras el pulso de zinc, aumentan los niveles de fluorescencia en ambos controles de forma significativa ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente), pero no se observó un aumento de este metal en los astrocitos en los que se redujo la traducción de la MT-3, que ya poseía unos altos niveles de zinc en condiciones basales.

Tras la cuantificación de los valores de fluorescencia de la inmunocitoquímica para MT-3 de cada uno de los tratamientos (figura 75), podemos observar como los astrocitos con el plásmido siARN, tras el silenciamiento génico, muestran una clara reducción en la expresión de la MT-3 respecto a los astrocitos con el plásmido control (t de Student, $p < 0,05$).

Por lo que concluimos que los astrocitos tras el silenciamiento de la MT-3 con el siARN, sufren una reducción en la expresión de la metalotioneína 3 de alrededor de un 14% respecto a los niveles normales de expresión de la MT-3.

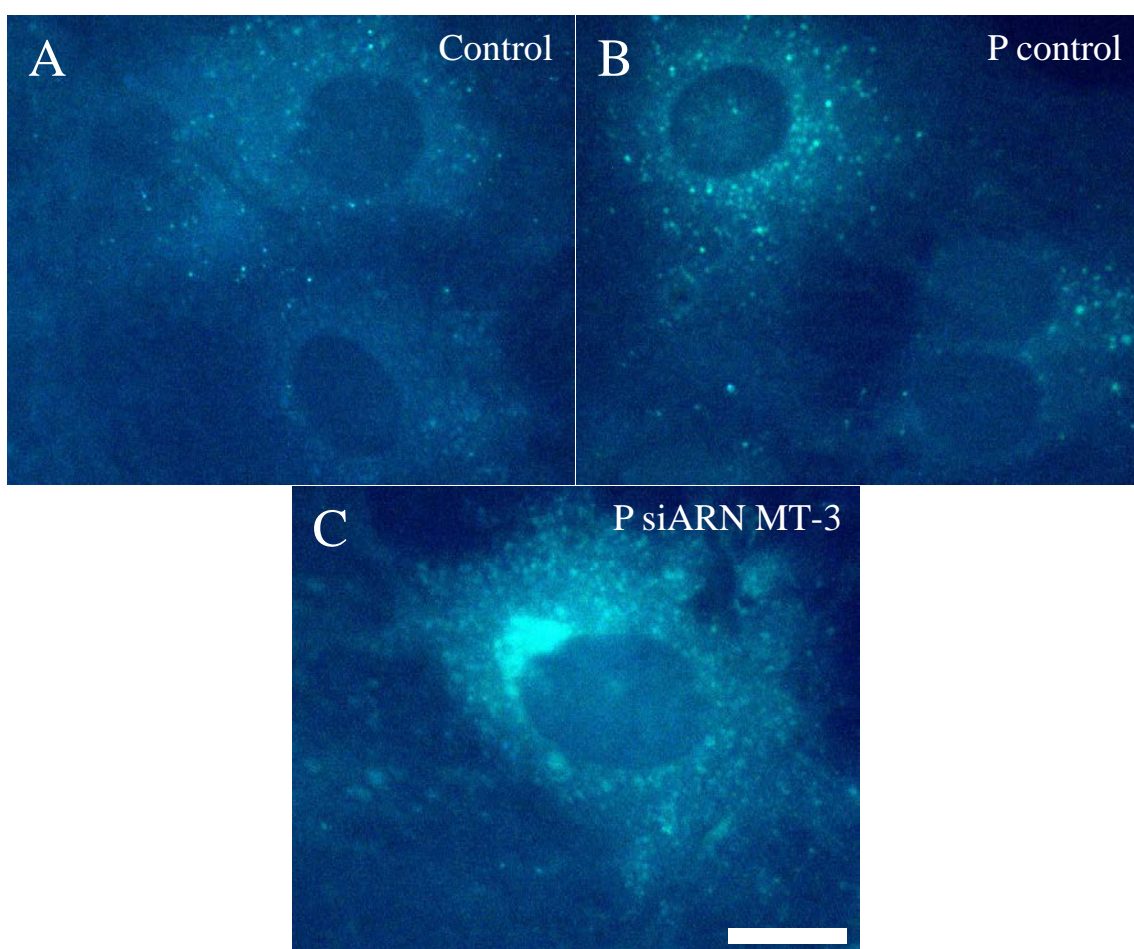


Figura 73. Efecto del silenciamiento de ARN para la MT-3 en astrocitos Ts65Dn.

Imagen representativa mostrando las diferencias entre los niveles basales de zinc en cultivos de astrocitos Ts65Dn marcados con TSQ en células control (A), transfectadas con el plásmido de control (B) y transfectadas con el plásmido siARN para la MT-3. Observamos como los astrocitos Ts65Dn transfectados con el plásmido con siARN para la MT-3 poseen un nivel de fluorescencia mayor que los dos controles. Se observa la presencia de zincosomas en todos los tratamientos en astrocitos trisómicos en condiciones basales. Escala: 20 μ m.

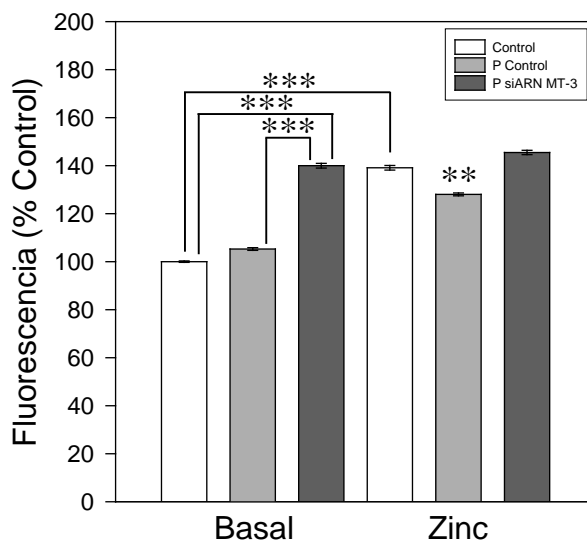


Figura 74. Zinc basal y capturado en astrocitos Ts65Dn tras el silenciamiento génico.

Gráfico mostrando los niveles de emisión de fluorescencia con el fluorocromo TSQ, tanto en condiciones basales como después de la carga de zinc exógeno en cultivo de astrocitos Ts65Dn en los tres grupos analizados. Vemos el gran aumento del nivel de zinc con la transfección del plásmido siARN para la MT-3 en condiciones basales. Y tras el pulso de zinc, aumentan de forma significativa ambos controles, pero no el plásmido con siARN para la MT-3 que ya tenía valores altos en condiciones basales. Nota: ** sobre quinta columna representa la significación entre la segunda y la quinta columna. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, ** p < 0,01; *** p < 0,001, n = 360 células).

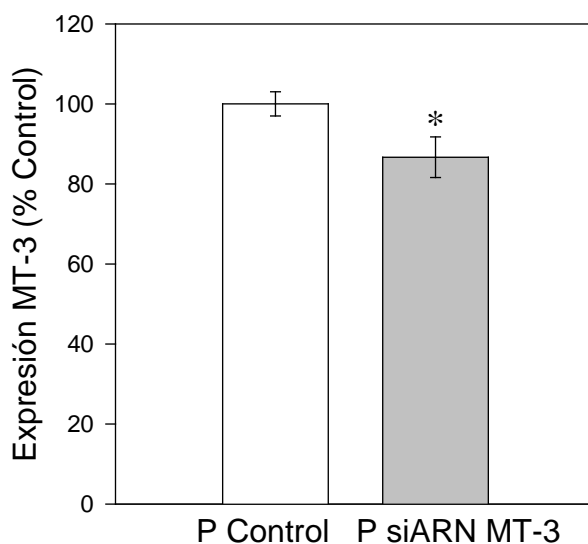


Figura 75. Expresión de MT-3 en astrocitos Ts65Dn tras el silenciamiento génico.

Gráfico mostrando la expresión de MT-3 en el citosol de astrocitos Ts65Dn transfectados con el plásmido control o con el plásmido que contiene el siARN para la MT-3. Podemos ver como los astrocitos transfectados con el plásmido con siARN MT-3 presentan unos niveles de expresión menores que los del plásmido control. Los asteriscos indican diferencias significativas (t de Student, * p < 0,05, n = 163 células).

V. DISCUSIÓN

El zinc es el oligoelemento más abundante en el sistema nervioso (Paoletti *et al.*, 2009), forma parte de muchas proteínas, enzimas y factores de transcripción, siendo esencial para el correcto funcionamiento de multitud de funciones y procesos celulares (Takeda, 2000; Jeong y Eide, 2013), por lo que el mantenimiento de la homeostasis de este metal iónico es fundamental. De hecho, en algunos síndromes como el Síndrome Alcohólico Fetal y el Síndrome de Down, y en la enfermedad de Alzheimer, se han encontrado alteraciones en la homeostasis de zinc (Carey *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2007; Panayi *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2010). Nosotros hemos centrado nuestra atención precisamente en el SNC, para aportar nueva información sobre la relación entre el zinc y la función astrocitaria. Hemos utilizado células gliales, que constituyen el 90% de las células neurales. De entre la multitud de funciones que llevan a cabo las células astrocitarias, una de las más importantes es la de la regulación homeostática del microambiente celular neuronal, eliminando el zinc de la hendidura sináptica en donde llega a 100 μM (Molnár y Nadler, 2001) para mantener el funcionamiento normal de las sinapsis, lo cual contribuye a la mejor función cerebral (Bitanhirwe y Cunningham, 2009).

Hemos estudiado la función astrocitaria en el mantenimiento de la homeostasis del zinc en distintos modelos de alteración de la función neural, una inducida por factores externos (SAF) y otra genética (SD) concretamente, evaluar los niveles de zinc de los astrocitos y su capacidad de capturar zinc extracelular. Para ello, hemos tenido que poner a punto procedimientos para la estabilización histológica del zinc iónico celular y para la ultraestructura de los zincosomas con microscopía electrónica de transmisión.

1. MODELOS UTILIZADOS.

En esta tesis se ha estudiado la captación y almacenaje de zinc iónico utilizando cultivos primarios de astrocitos. Los cultivos celulares permiten la administración directa de sustancias y el estudio de los efectos producidos incluso a nivel individual, de cada célula, en tiempo real. En general, la puesta a punto, perfeccionamiento y realización de estudios *in vitro* se ha llevado a cabo con el objetivo de reducir o minimizar los ensayos *in vivo*. La principal crítica a estos métodos es que las células se encuentran en una placa, y no se comportan igual que lo harían en el cerebro completo, porque el ambiente no se replica completamente. No obstante, las técnicas de cultivos celulares llevan muchos años de desarrollo y sus resultados son, en determinadas condiciones, considerados válidos y aceptados como modelos alternativos a los estudios en animales. También encontramos, para el sistema nervioso, modelos tanto con cultivos de astrocitos como de neuronas (Tomás *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010; Arends *et al.*, 2015).

Para los estudios del modelo del SAF, se ha seleccionado el cultivo primario de astrocitos obtenidos a partir de cerebros de rata Wistar recién nacidas (P0), cultivados en

presencia de etanol (Renau-Piqueras *et al.*, 1989), y para el estudio del efecto del Síndrome de Down, de ratones Ts65Dn recién nacidos (P0). Ambos cultivos se realizaron bajo el mismo protocolo de aislamiento y siembra (Renau-Piqueras *et al.*, 1989). Los astrocitos pueden proliferar en medio DMEM en presencia de suero bovino fetal, lo que da lugar a un enriquecimiento en las células con una mayor tasa proliferativa, en este caso las células gliales. Los ensayos se realizaron a los 7 días de cultivo, cuando las células ya han alcanzado su máxima capacidad proliferativa y empiezan a diferenciarse (Lu *et al.*, 1991; Vallés *et al.*, 1994). Tras ser caracterizadas inmunocitoquímicamente, se observó que alrededor de un 95% de las células presentes en este tipo de cultivo eran células gliales (GFAP positivas).

Para los estudios del efecto del SAF se ha usado un modelo descrito anteriormente (Renau-Piqueras *et al.*, 1989) sobre la captura de zinc en astrocitos, las células fueron incubadas en un medio completo que contenía etanol a una concentración de 30 mM (138 mg/dl), desde el momento de la realización del cultivo hasta el día del ensayo. Esta concentración es equivalente a los niveles en sangre que se observan en mujeres en estado de gestación que beben de forma crónica, aproximadamente lo que se observa en una mujer de unos 60 kg de peso, que consume de 3 a 5 bebidas en una hora (Eckardt *et al.*, 1998). Este modelo de SAF ha sido descrito anteriormente usado por otros autores (Renau-Piqueras *et al.*, 1989; Pascual y Guerri, 2007). Esta concentración de 30 mM de etanol está en el rango considerado no dañino para la viabilidad de los astrocitos de entre 21,7-43,4 mM (100-200 mg/dl), por encima de las cuales el daño celular impide ver otros efectos (Pantazis *et al.*, 1993). Esta concentración de 30 mM se mantuvo constante a lo largo del cultivo con cambios de medio cada 48h. Vimos, al igual que habían demostrado estudios previos (Tomás *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2010), que tras la exposición al etanol, los astrocitos no se vieron gravemente afectados por el tratamiento, mostrando durante todos los días de cultivo, una morfología normal y una distribución homogénea sobre la placa/cubre de cultivo. De igual modo, los astrocitos procedentes de los ratones trisómicos, no mostraron alteraciones morfológicas ni estructurales en comparación a los controles, mostrando un comportamiento indistinguible a lo largo del cultivo.

Hemos encontrado en los cultivos primarios de astrocitos, como se ha visto anteriormente (Lange *et al.*, 2012), la existencia de variabilidad entre los distintos cultivos a la hora de realizar las cuantificaciones, basándonos en que la respuesta celular a los tratamientos no era siempre de la misma magnitud, aun realizando los cultivos celulares primarios con el mismo protocolo, bajo las mismas condiciones, y observando una morfología y densidad celular similares. Esto puede deberse a las diferencias entre los individuos utilizados, aunque todos los animales tenían la misma edad (P0), el hecho de realizar un cultivo primario para cada experimento con los animales recién nacidos, podría generar las pequeñas diferencias encontradas entre los cultivos. Durante los experimentos, los controles empleados para cada

tratamiento o incubación se llevaron a cabo con células procedentes del mismo cultivo, de esta manera los resultados se comparaban entre células semejantes.

2. DETECCIÓN DEL ZINC.

En biología celular el término zinc iónico hace referencia a una fracción del zinc celular que puede ser detectable histoquímicamente, que se estima alrededor del 15% del contenido total de zinc en el cerebro (Szerdahelyi y Kasa, 1987), por lo que la mayoría del zinc presente en las células es indetectable histoquímicamente. Sin embargo, las células pueden movilizar el zinc en un sentido u otro, intercambiándolos tras diferentes estímulos o después de su agotamiento (Sekler *et al.*, 2007). Este zinc iónico puede detectarse mediante métodos directos basados en la unión de una molécula marcadora al zinc, y que como consecuencia de esta unión, la presencia de zinc puede generar la aparición de color o fluorescencia en ese punto (Maske, 1955; Frederickson *et al.*, 1987; Zalewski *et al.*, 1993). Son métodos utilizados tanto en cultivos como en rebanadas (Varea *et al.*, 2001). El zinc también puede detectarse mediante métodos indirectos (métodos autometalográficos), mediante la precipitación del zinc y su posterior amplificación con plata (Timm, 1958; Danscher, 1981; Danscher, 1982).

El uso de fluorocromos específicos para diferentes elementos celulares, supone un método sencillo y eficaz para su estudio en células vivas. Existe una gran variedad de fluorocromos disponibles para la detección de zinc. Para nuestro estudio, el marcador ideal sería aquel que permitiera atravesar las membranas celulares y no solo acceder al citosol, y además tener una buena afinidad por el zinc sin generar artefactos ni falsos positivos. El FluoZin-1 y 2 son capaces de detectar zinc en un amplio rango de 0,1–100 μM con una mínima interferencia con el calcio (Gee *et al.*, 2002). El FluoZin-1 permite mediciones ratiométricas, de forma similar al Fura-2 con el calcio, y ha sido usado para la caracterización de proteínas de unión a zinc (Bauer *et al.*, 2008). El Rhodzin-3 es un fluorocromo con una buena afinidad por el zinc ($K_d \sim 65$ nM) utilizado principalmente para medir niveles de zinc mitocondriales (Sensi *et al.*, 2003). El marcador Mag-fura-2 con una buena afinidad por el zinc ($K_d \sim 20$ nM) también ha sido usado por su rango de detección de zinc (1-100 nM) (Simons, 1993) pero se han encontrado artefactos en su uso al marcar zinc en neuronas (Dineley *et al.*, 2002). El marcador Zinquin es capaz de atravesar la membrana plasmática y posee una gran afinidad por el zinc ($K_d \sim 1$ μM), es muy útil para pruebas cualitativas, aunque también puede actuar como ionóforo, intercambiando un Zn^{2+} por dos H^+ (Snitsarev *et al.*, 2001). De entre todos los fluorocromos, el TSQ es uno de los que tienen una mayor intensidad de emisión de fluorescencia para una concentración de zinc determinada. Posee una buena afinidad por el zinc ($K_d \sim 0,01$ -10 μM) y además tiene la capacidad de atravesar membranas para unirse al zinc iónico (Frederickson *et al.*, 1987). El

marcador TFLZn está basado en el fluorocromo TSQ, posee una moderada afinidad por el zinc ($K_d \sim 20 \mu\text{M}$) y se ha usado para estudiar zinc en vesículas sinápticas (Budde *et al.*, 1997). El Newport Green DCF (Sensi *et al.*, 1999), posee una longitud de onda de excitación alta (520 nm) y por tanto, menos energética que el TSQ, con lo cual el daño inducido a las células es menor. Tiene una moderada afinidad por el zinc ($K_d \sim 1 \mu\text{M}$) con lo cual la interferencia en el sistema es menor, y es totalmente insensible a la concentración de calcio (Zhao *et al.*, 2009). Por otro lado, el FluoZin-3 AM es un fluorocromo para el zinc más sensible ($K_d \sim 15 \text{nM}$), capaz de detectar bajas concentraciones de zinc y pequeños cambios en su concentración (1-100 nM). Recientemente han aparecido otros fluorocromos como el Pyridine-pyridone, es una molécula de bajo peso molecular que facilitan su acceso al zinc celular, pero su eficacia está por comprobar (Hagimori, 2013).

De entre todos los fluorocromos existentes, para el marcaje del zinc iónico celular, se ha utilizado el fluorocromo TSQ (Frederickson *et al.*, 1987), por su capacidad para atravesar membranas, como el Zinquin, pero con un rango más amplio de detección de zinc, por su baja constante de disociación, por su insensibilidad para unirse al calcio, y porque no se han encontrado evidencias de que pueda generar artefactos con su marcaje. Este fluorocromo se ha utilizado previamente sobre tejido vivo (Varea *et al.*, 2001) y sobre las monocapas en cultivo (Paski y Xu, 2001). Las ventajas del uso de este método son que permite la detección *in situ* del zinc iónico, el tiempo de incubación necesario para conseguir marcaje es bastante reducido (10 minutos aprox.), y no necesita ser metabolizado para ser activo (como sucede con los fluorocromos esterificados, como el FluoZin-3 AM). Entre los inconvenientes está la imposibilidad de realizar mediciones exactas de la concentración de zinc, únicamente se pueden realizar comparaciones respecto a un control y además, la emisión de fluorescencia del complejo zinc-TSQ es sensible al pH del medio en el que se encuentra (Savage *et al.*, 1989). Al igual que los demás fluorocromos, el TSQ requiere de una excitación con una longitud de onda determinada para poder observarse, en este caso luz ultravioleta, pero las células no pueden soportar esta iluminación durante largos periodos de tiempo porque se alteran como consecuencia de la radiación, por lo que las fotos se tomaron con un tiempo de exposición de 100 milisegundos. Las longitudes de onda de excitación y de emisión son compatibles con muchos otros fluorocromos específicos para distintos orgánulos (LysoTracker, MitoTracker y FM1-43). Esta fluorescencia, por la estructura de su fluorocromo y por la acción de las células que están vivas, es muy lábil, por lo que tiempos prolongados de iluminación, además de dañar las células, extinguen la fluorescencia.

La presencia de cationes multivalentes es muy común en las células, como son: Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , y Mg^{2+} , estos podrían interferir en las mediciones de zinc con el marcador TSQ, pero únicamente si estos cationes se encuentran presentes en exceso, concretamente 20,

33, 60, 500 y 30.000 veces la concentración de zinc, respectivamente (Reyes *et al.*, 1994), aunque según nuestras observaciones, la fluorescencia que detectamos era debida exclusivamente al zinc.

El espectro de emisión de fluorescencia del complejo zinc-TSQ es semejante al del NADH intracelular (Shuttleworth, 2010). Este hecho podría interferir en el estudio, dando valores de fluorescencia sobreestimados, sin embargo bajo nuestras condiciones experimentales, las células, ya sea sólo con zinc o sólo con TSQ, muestran niveles muy bajos de fluorescencia, lo que nos llevó a descartar cualquier duda sobre el origen específico de la fluorescencia.

Analizamos diversos marcadores orgánulares, y encontramos colocalización entre la marca fluorescente de los zincosomas con TSQ y el marcador de endosomas tempranos FM1-43 (figura 33). Esto indica que, gran parte del zinc capturado por los astrocitos es llevado a cabo mediante la ruta endocítica, probablemente dependiente de clatrina (Varea *et al.*, 2006). También encontramos zincosomas no coincidentes con endosomas tempranos, por lo que serían vesículas contenedoras de zinc que no se habrían formado tras el pulso de zinc exógeno, sino que ya existirían anteriormente en la célula. Del mismo modo, encontramos endosomas que no presentan correspondencia con el marcador TSQ. Esto indica que el proceso de captación de zinc exógeno es específico, y que no todas las vesículas de nueva formación marcadas con FM1-43 podrían capturar el zinc exógeno. El marcador FM1-43 permite la monitorización del rápido proceso de endocitosis en células vivas, gracias a la conversión del fluorocromo en un polímero electrodenso con diaminobencidina mediante fotoconversión, lo que permitiría estudiar la formación de vesículas al MET (Schikorski, 2010).

Para el marcaje del zinc en los cultivos celulares también se han utilizado de entre todos los fluorocromos disponibles otros dos marcadores, el Newport Green DCF y FluoZin-3 AM, ambos fluorocromos se han utilizado previamente para marcar el zinc en cultivos celulares (Sensi *et al.*, 1999), y para realizar estudios cinéticos y de cuantificación, y para detectar los niveles de zinc citoplasmático bajo diferentes condiciones experimentales (Canzoniero *et al.*, 1997, Gee *et al.*, 2002). Como inconveniente, ambos fluorocromos al igual que otros muchos, deben ser metabolizados por la célula para ser activos, y una vez desesterificados, quedan atrapados en el citosol, por lo que en principio, permiten el estudio de la entrada de zinc al citosol, pero no permiten el marcaje de orgánulos subcelulares como vesículas sinápticas o, como hemos visto, para los zincosomas.

Los resultados obtenidos tras los ensayos de captación de zinc extracelular en cultivos primarios de astrocitos, desaconsejan el uso del fluorocromo Newport Green DCF, ya que solo marca el zinc citoplasmático y no zincosomas tras la captura de zinc exógeno (figura 23). Descartamos el uso de este fluorocromo, ya que no muestra un gran aumento en la fluorescencia

tras la captura de zinc exógeno, siendo los niveles de brillo muy bajos. Esto era debido a que el zinc se encontraba en compartimentos celulares a los que el fluorocromo NPG no fue capaz de acceder. Y fue al añadir el ionóforo piritionato de zinc, cuando se permeabilizó la membrana plasmática, permitiendo la entrada de zinc extracelular al citoplasma, cosa que parece no ocurrir de manera fisiológica. Posteriormente, para comprobar que las células habían capturado el zinc del pulso, se les añadió el marcador TSQ, produciéndose una considerable reducción de los niveles de fluorescencia, debido a que el TSQ posee una constante de disociación más baja que el NPG (K_d TSQ: 10 nM; K_d NPG: 1000 nM), por lo que sería capaz de unirse a los iones zinc inicialmente unidos al NPG. La especificidad de los marcadores fluorescentes para el estudio de iones metálicos varía según el modelo celular utilizado y el ambiente intracelular (Figuroa *et al.*, 2014), por lo que para nuestra finalidad de estudio, el NPG no sería el mejor marcador. Sin embargo, aunque el NPG es un marcador usado en estudios de detección de zinc en cultivos de astrocitos (Segawa *et al.*, 2014), para estudios de captación de zinc exógeno y marcaje del zincosomas, hemos comprobado que no resulta muy efectivo, como demuestran los resultados. Con el fluorocromo FluoZin-3 AM hemos visto algo similar, este fluorocromo se testó con otro modelo celular, como son los cultivos primarios de neuronas. Tras realizarse incubaciones en paralelo con astrocitos y neuronas, obtuvimos una falta total de marca en los astrocitos (figura 25). Por lo que este fluorocromo también fue descartado para el marcaje y seguimiento del zinc exógeno en cultivos de astrocitos, al no encontrar ningún tipo de marca. Por otro lado, las neuronas en cultivo sí mostraron fluorescencia por el citoplasma, ya que este fluorocromo es normalmente usado para la detección de zinc en neuronas (Gee *et al.*, 2002; Bastian y Li, 2007).

A la vista de los resultados, se eligió el fluorocromo TSQ como marcador más apropiado para el marcaje del zinc en astrocitos, y con el que se realizaron los posteriores ensayos de captación de zinc extracelular en esta tesis. Debido a la falta de información disponible en la bibliografía sobre este tema, se realizaron diversos ensayos de fijación y postfijación evaluando los resultados con dos métodos de marcaje, fluorescencia con TSQ y autometalografía con Neo-Timm, con el objetivo de optimizar las condiciones experimentales.

Para el revelado autometalográfico existen diversos métodos, pero para la detección de zinc los más utilizados son el método de Neo-Timm (Danscher *et al.*, 1981) y el método de Danscher (Danscher, 1982). El método de Neo-Timm está basado en la precipitación de zinc con sulfuro sódico, formando precipitados de zinc-sulfuro, que posteriormente se amplifican autometalográficamente. Por otro lado, el método de Danscher se basa en la precipitación del zinc con selenito sódico, que se administra a las células vivas y son los precipitados de zinc-selenio los que se amplifican. No todo el zinc de un organismo se puede detectar ni amplificar, el método autometalográfico solo puede detectar el zinc presente en las células de forma iónica

o débilmente unido, que suele acumularse en vesículas como las sinápticas y secretoras, y lisosomas (Danscher *et al.*, 1985).

Aunque se ha sugerido que el método autometalográfico puede detectar otros metales como plomo, hierro, cobre o aluminio, se necesitan altas concentraciones de sulfuro sódico y valores altos de pH. Por ello, en condiciones normales de metabolismo (pH 7,4), no se forman los nanocristales y por consiguiente, no se pueden detectar (Danscher *et al.*, 1982; Danscher y Stoltenberg, 2005), por lo que el método de Neo-Timm es específico para el zinc. La principal ventaja del método de Danscher, es que los precipitados de zinc-selenio son más estables que los de zinc-sulfuro de Neo-Timm (Stoltenberg y Danscher, 2000). Ambos métodos permiten el uso de aldehídos para fijar las células, y al tratarse de un método autometalográfico, los precipitados se amplifican y la marca es más intensa.

Los inconvenientes más comunes del método de Neo-Timm son los derivados de la sobre fijación con iones sulfuro, que puede inducir un exceso de grupos SH en las proteínas. Este exceso de grupos SH puede quelar los iones de plata del revelador, actuando como centros catalíticos durante el revelado autometalográfico (Bell y Vallee, 2009). Bajo estas condiciones, se pueden producir depósitos de plata falsos positivos. Por otro lado, el principal problema que plantea el método de Danscher es la adecuación de la dosis de selenito sódico a administrar. Ya que una dosis elevada de selenito sódico provoca la muerte de las células en un muy corto espacio de tiempo y por el contrario, una dosis baja provoca el denominado efecto campo (Slomianka, 1992), que es la ausencia de precipitado, falsos negativos, en zonas de elevada concentración de zinc. El uso de estas técnicas plantea el problema de las mediciones densitométricas, ya que la cantidad de plata depositada tras el revelado es una estimación indirecta de los centros catalíticos (precipitados de zinc), pero no son proporcionales. La cuantificación precisa de los iones zinc en las muestras presenta dos problemas: el primero, que los depósitos de plata en la superficie de la muestra ocultan los precipitados de zonas inferiores, y el segundo, que los granos de plata formados sobre los depósitos de sulfuro o seleniuro de zinc presentan tamaños y distribuciones dependientes de los parámetros del revelado (temperatura, luz y tiempo de revelado). Ya que el uso de métodos autometalográficos permiten graduar la intensidad de la tinción, cambiando las condiciones de revelado. De esta manera, la cantidad de plata depositada está directamente relacionada con la cantidad de zinc precipitado existente en las células y con el tiempo de revelado (Martínez-Guijarro *et al.*, 1987). Por este motivo, la cuantificación de precipitados de plata sobre los iones zinc puede ser sesgada en medidas densitométricas (López-García *et al.*, 2002). Aunque estos problemas son despreciables si se revelan juntas (en la misma solución y durante el mismo tiempo) todas las muestras de un experimento, siendo así comparables.

En esta tesis se han ensayado estos dos métodos de precipitado de zinc, el del sulfuro sódico tras la fijación y el del selenito sódico sobre las células vivas. Aunque no se han encontrado estudios que utilicen estas técnicas en cultivos celulares. En los resultados (apartados 3.1 y 3.2), podemos apreciar como el método de precipitado de zinc basado en la incubación de las monocapas de astrocitos en una solución con selenito sódico genera una marca de precipitado puntiforme de plata metálica por todo el citoplasma tras el revelado autometalográfico (figura 40), tanto en células con un pulso de zinc como en células sin pulso. Este resultado hace que las monocapas sean indistinguibles, y por lo tanto, que este método no sea válido para nuestro estudio de captación de zinc en astrocitos. Aunque el revelado autometalográfico precipitando el zinc por el método del selenito sódico es equivalente al marcaje con ditizona y al revelado con Neo-Timm (Frederickson *et al.*, 1987, 1989). Este precipitado de plata sin pulso de zinc exógeno tras el revelado puede ser debido a que, el selenito sódico normalmente usado en tejidos nerviosos (Danscher, 1982) y administrado al animal vivo durante la perfusión, tiene que reducirse para poder actuar como precipitante, y esto parece no ocurrir de la misma manera que en los cultivos celulares por tener una vía de administración diferente, dando un resultado final diferente. En los cultivos celulares, el selenito actúa directamente sobre las células, y en los tejidos tiene que atravesar capilares y matrices extracelulares que no se encuentran en los cultivos. Por el contrario, con el método de precipitación del zinc utilizando sulfuro sódico post-fijación, el resultado fue que en las monocapas de astrocitos con pulso de zinc, tras el revelado de Neo-Timm, se marcaron muchos zincosomas con precipitados de plata metálica por el citosol, y las monocapas sin pulso de zinc no mostraron ningún tipo de marca (figura 41), obteniendo un marcaje específico y diferencial. Es un resultado esperado, después de lo visto anteriormente con la fluorescencia de TSQ, en la que solo se observa marca sobre las células con un pulso de zinc exógeno (figura 26). Por lo que podemos afirmar que, este método de precipitación de zinc es más adecuado que el del selenito sódico, ya que precipita y marca el zinc de forma diferencial. La fijación de las células se llevó a cabo antes de la precipitación con sulfuro sódico, porque vimos como las células se despegaban de la placa de cultivo tras el uso del sulfuro sódico, ya que éste puede actuar como quelante de zinc de proteínas de unión a matriz (Suh *et al.*, 2000).

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

Comprobamos que la formación de zincosomas venía determinada por la presencia de zinc extracelular, y que solamente las células a las que se les aplicaba un pulso de zinc exógeno mostraban zincosomas marcados en el citosol con TSQ (figura 26). Por lo que, la incubación con zinc exógeno es la responsable de la formación de los zincosomas, y la incubación con el marcador TSQ es la que nos permite visualizarlos con fluorescencia (Haase y Beyersmann, 2002). Hemos comprobado que los zincosomas marcados con TSQ son estructuras celulares de reciente formación que se forman tras el pulso de zinc exógeno. Además, el marcador TSQ no presenta ningún tipo de marca en los astrocitos sin zinc exógeno, lo que indica que este fluorocromo no se une a otros cationes divalentes o éstos están en muy baja concentración y no se detectan con este fluorocromo (Reyes *et al.*, 1994). Estos zincosomas aparecen localizados principalmente en el citosol, con una marca muy baja en el núcleo (Haase y Beyersmann, 2002).

Determinamos que la densidad de zincosomas marcados es dependiente del tiempo de incubación con TSQ, del TPEN y del zinc, de forma que vemos mayor cantidad de vesículas contenedoras de zinc y más nítidas con el tiempo de incubación de 10 minutos (figura 27). El tiempo de incubación con zinc es un factor importante, por lo que el objetivo era encontrar el menor tiempo de incubación posible. Pero al mismo tiempo, necesitamos que los astrocitos respondan capturando zinc del espacio extracelular, poder observar y cuantificar los zincosomas, y ver cambios en su proceso de formación.

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

3. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LOS ZINCOSOMAS.

Los zincosomas son partículas transitorias que contienen zinc y son móviles, cuya ultraestructura no ha sido totalmente establecida (Zalewski *et al.*, 1991; Varea *et al.*, 2006). A lo largo de los experimentos, hemos encontrado muchos problemas para poder localizar los zincosomas y poder observarlos al MET. Esto ha sido debido a su distribución homogénea dentro de las células y a la falta de una estructura determinada específica fácil de localizar. Finalmente, utilizamos sucesivamente técnicas de microscopía óptica, de microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión para correlacionar topográficamente algunos zincosomas marcados seleccionados y llegar a observar su ultraestructura.

Con el objetivo de caracterizar y correlacionar la ultraestructura de los zincosomas al MET, éstos se marcaron con los marcadores TSQ y ditizona, que son equivalentes en el marcaje de zinc (Jindal *et al.*, 1993). Pudimos ver cómo, la marca rojiza de la ditizona con campo claro, coincide con la marca fluorescente del TSQ (figura 57). Se realizó el seguimiento de los zincosomas desde las monocapas vivas en cultivo hasta su estudio al microscopio electrónico. Se seleccionaron dos zonas donde los zincosomas eran particularmente fáciles de identificar, dada la dificultad de hacer el seguimiento de estructuras tan pequeñas y homogéneas en las monocapas de astrocitos. Tras el proceso de fijación, inclusión y corte, se logró localizar las zonas de estudio en varios cortes ultrafinos, viéndose en varios de ellos, como los zincosomas anteriormente fluorescentes con TSQ (figura 55) o rojizos en campo claro (figura 57), correspondían claramente con estructuras de tipo vesicular. Estas vesículas, de 450 nm aprox. se veían aparentemente vacías al MET con la membrana casi ausente, posiblemente debido al largo proceso de fijación, post-fijación e inclusión hasta llegar al MET, donde el zinc contenido en los zincosomas se habría perdido. Se ha descartado el efecto artefactual del marcaje con TSQ y ditizona, aunque no el posible efecto de la observación con luz ultravioleta sobre la estructura. Además, a la hora de realizar la inclusión de las monocapas de astrocitos para el MET, no se

utilizó acetato de uranilo utilizado normalmente para contrastar los ácidos nucleicos. El acetato de uranilo para el MET se suele preparar al 2% en agua destilada y tiene un pH entre 4,2 y 5,2, precipitando por encima de pH 6 (Karnovsky, 1967). Por lo que decidimos no utilizar esta solución por si el bajo nivel de pH pudiera eliminar o solubilizar el zinc previamente precipitado con sulfuro sódico impidiendo de ese modo su posterior detección.

A mayores aumentos, se analizó la zona de estudio donde se realizó la correspondencia, y observamos una gran abundancia de pequeñas vesículas de endocitosis localizadas cerca de la membrana plasmática, posiblemente generadas como consecuencia del pulso de zinc exógeno aplicado a las monocapas, y que los astrocitos, en un proceso activo de captación por endocitosis, se encargan de capturar del medio extracelular. Estas pequeñas vesículas generadas por endocitosis en la membrana plasmática, aparecen fusionándose para formar zincosomas más grandes (figura 56). Las vesículas más pequeñas que vemos con el MET, no se observan con fluorescencia, posiblemente porque quedan enmascaradas por la fluorescencia de las vesículas más grandes, ya que el microscopio de fluorescencia no tiene la resolución suficiente como para detectar la emisión de fluorescencia de TSQ de estas pequeñas vesículas, a lo que hay que añadir la extinción de la fluorescencia, que será más rápida en donde menos TSQ haya. Estos resultados a nivel ultraestructural evidencian nuevamente el origen endocítico de los zincosomas, como ya habíamos determinado mediante la colocalización del marcador TSQ con el marcador de endocitosis FM1-43 (apartado 1.6). El destino de estas vesículas contenedoras de zinc, tras la colocalización con endosomas tempranos, acaba siendo en vesículas de tipo lisosomal (Varea *et al.*, 2006). Estas pequeñas vesículas de endocitosis y los zincosomas que hemos detectado con TSQ y ditizona los hemos visto íntimamente relacionados con los filamentos del citoesqueleto (figura 56), como otros autores vieron anteriormente (Zalewski *et al.*, 1991), lo que les permitiría un rápido tránsito desde la membrana plasmática hacia los zincosomas grandes para su acumulación y procesado, y finalmente su almacenamiento o eliminación. Aunque habría que realizar técnicas inmunocitoquímicas post-inclusión contra varios elementos del citoesqueleto para saber con exactitud cuál es el que utilizan para su movimiento a través del citosol.

Finalmente, fuimos capaces de localizar el contenido en zinc en el interior de los zincosomas (figura 58). Para ello, en este caso, se evitó iluminar las monocapas con luz blanca o UV que pudieran alterar la estructura de las células, aunque en placas paralelas se comprobó la formación de zincosomas. Algunos cortes semifinos fueron revelados con Neo-Timm (figura 58), y aparecían células marcadas con precipitados de plata tras el revelado. Los cortes semifinos revelados se cortaron en ultrafinos para su análisis ultraestructural. Encontramos algunos zincosomas marcados con el precipitado de plata metálica depositada sobre el zinc en su interior, correspondiente a lo visto en los cortes semifinos. En los cortes ultrafinos

consecutivos, y más alejados de la cara del semifino que estuvo en contacto con el revelador, pudimos comprobar que la misma estructura vesicular marcada anteriormente con plata, aparecía ahora marcada con un precipitado de zinc granular y ramificado propio del método sulfhídrico-osmio (López-García *et al.*, 1984). Consiguiendo confirmar que los zincosomas contienen zinc por dos métodos de detección de zinc diferentes sobre la misma estructura.

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

4. DISTRIBUCIÓN Y CAPTACIÓN DE ZINC EN MODELOS DE SAF Y SD.

4.1 Efectos del modelo de síndrome alcohólico fetal.

En esta tesis se han estudiado los efectos del SAF usando el modelo celular *in vitro* con astrocitos. El etanol puede causar trastornos graves durante el desarrollo que afectan al SNC. Las células gliales en este síndrome también se ven afectadas, incluyendo alteraciones estructurales y funcionales en la gliogénesis y en las interacciones neurona-glia, lo que sugiere un papel como blanco directo de la toxicidad por etanol participando en el desarrollo de las alteraciones cerebrales inducidas por el etanol, y no como un efecto secundario (Guerra y Renau-Piqueras, 1997; Guerra *et al.*, 2001). Los efectos tóxicos del etanol sobre los astrocitos son bastante importantes, ya que el etanol puede atravesar la placenta y llegar al feto, ejerciendo su efecto tóxico durante el desarrollo, que es el momento más delicado ya que es cuando se establece el andamiaje que va a permitir formar todas las conexiones. Se ha visto como el etanol interfiere en la gliogénesis y neurogénesis durante el desarrollo (Rubert *et al.*, 2006). Lo que acaba ocasionando el SAF, con efectos que permanecen hasta la vida adulta.

La funcionalidad de los astrocitos puede verse afectada, después de la exposición al etanol, en el tráfico celular, incluyendo la endocitosis (Megías *et al.*, 2000), el transporte nucleocitoplasmático (Marín *et al.*, 2008) y la secreción (Tomás *et al.*, 2005). Todas estas funciones son importantes en el mantenimiento de la homeostasis del SNC. La alteración de algunas de estas funciones pueden provocar la aparición de diferentes patologías neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (Suh *et al.*, 2000), muchas de las cuales se refieren a un desajuste

en la homeostasis de iones metálicos, y en algunos casos pueden ser paliados con agentes quelantes (Bolognin *et al.*, 2009; Zatta *et al.*, 2009).

Además del deterioro en el desarrollo neuroconductual, observaciones clínicas y experimentales tras el consumo de alcohol, muestran una reducción en los niveles de zinc, tanto plasmáticos como en diversos tejidos (Carey *et al.*, 2000). Los bajos niveles de zinc se han relacionado con diferentes alteraciones, tanto fisiológicas como durante el desarrollo (Sandstead *et al.*, 2000). La exposición al etanol también causa un descenso en los niveles de zinc en diversos órganos, como el cerebro, los pulmones, el hígado, los riñones y el bazo en ratones (Floriańczyk, 2000). Se ha encontrado una reducción en los niveles de zinc tras la exposición al etanol en cerebros de ratas prenatales (Savage *et al.*, 1989), en neonatos de ratas (Samson y Diaz, 1981), y en ratas adultas (Kasarskis *et al.*, 1985). Esta exposición crónica al etanol, provoca un descenso en la cantidad de zinc en el plasma, en el citosol y en orgánulos como el retículo endoplasmático y las mitocondrias; aumenta la expresión de transportadores de zinc (ZIP) en estos orgánulos, provocando una disfunción organular que desemboca en apoptosis celular (Sun *et al.*, 2015).

Los datos obtenidos en esta tesis indican claramente que, la exposición crónica moderada al etanol altera la homeostasis del zinc intracelular en los astrocitos en cultivo, tanto la reducción de los niveles basales de iones zinc citoplasmáticos (figura 59), como de la capacidad de captación del zinc exógeno añadido al cultivo (figura 60) (Ballestín *et al.*, 2011). La terapia más obvia contra los bajos niveles de zinc, parece ser la suplementación de zinc en la dieta para recuperar los valores normales o reducir los efectos del su déficit. En algunos casos, la suplementación durante el embarazo, parece mejorar los síntomas del déficit en los recién nacidos (Shah *et al.*, 2006). Sin embargo, esta suplementación no siempre ha dado resultados positivos, y la vía de administración (oral vs. intraperitoneal) es un factor importante (Carey *et al.*, 2003). Además, hay que considerar la dificultad de obtener buenos estudios de población, ya que no se obtuvieron resultados claros cuando se examinó el desarrollo neuroconductual (Shah *et al.*, 2006). Mientras que en otros estudios experimentales, parecía más clara la demostraron donde, la adición de zinc no pudo evitar la pérdida neuronal después del tratamiento de etanol (Chen *et al.*, 2001).

Nuestros experimentos están en concordancia con estas observaciones, ya que el etanol no sólo redujo los niveles basales de zinc en los astrocitos en cultivo, sino también la capacidad de las células para captar el zinc extracelular, medido por fluorescencia total y por la formación de zincosomas (figura 61). Así, los astrocitos en cultivo parecen tener la maquinaria celular para recuperar cualquiera de los depósitos intracelulares o limpiar la acumulación de zinc extracelular como en el caso de la hendidura sináptica (Lee *et al.*, 2012). Sin embargo, esta maquinaria en las células tratadas con alcohol parece estar afectada de tal manera, que no

permite que el zinc extracelular pueda ser capturado a las mismas tasas que las observadas en las células control. En consecuencia, dado que los astrocitos son los que controlan las barreras del SNC, parece razonable proponer que la entrada y la biodisponibilidad de zinc en las neuronas, podría ser muy baja o no lo suficiente, en función del grado de deterioro de los astrocitos expuestos al etanol.

El efecto más importante del tratamiento con etanol como modelo del SAF ha sido la reducción en la formación de zincosomas respecto a los astrocitos controles (figura 60). Hemos encontrado zincosomas de distintos tamaños, unos grandes muy brillantes y otros, de menor tamaño, más abundantes y menos brillantes. Vemos que la reducción en la densidad de zincosomas se debe principalmente a los zincosomas pequeños, que además son los que se encuentran próximos a la membrana plasmática y que forman los endosomas tempranos (Figura 62). También encontramos diferencias en las cinéticas de captación de zinc a distintos tiempos, siendo las diferencias más importantes en los tiempos largos, donde obtenemos mayores densidades de zincosomas marcados en astrocitos controles.

Los efectos del etanol sobre la captación de zinc exógeno pueden estar relacionados con una reducción de la actividad endocítica o una alteración de los mecanismos moleculares implicados en la entrada de zinc en la célula (Megías *et al.*, 2000). Parece que estos efectos, podrían constituir un mecanismo general de la toxicidad del etanol en las células. Los astrocitos poseen un sistema endocítico compuesto principalmente por clatrina, caveolas, endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas (Megías *et al.*, 2000). Y todos los procesos de endocitosis, ya sean mediados por receptor, endocitosis en fase fluida o endocitosis no mediada por receptor, se ven alterados por el etanol, afectando la endocitosis, la transcitosis y el tráfico intracelular de proteínas, como se ha demostrado con los niveles alterados de las proteínas caveolina, clatrina, rab5 y β -COP entre otras (Megías *et al.*, 2000). Hay resultados que están de acuerdo con la idea de que una serie de mecanismos separados desencadenados por el etanol participan en la acción global de etanol en el proceso de endocitosis. Algunos mecanismos probablemente se refieren a los cambios en la membrana plasmática, y por lo tanto, las alteraciones inducidas por etanol en la composición de la membrana plasmática podrían interferir con la capacidad de la célula para responder al microambiente externo (Sun *et al.*, 1987; Renau-Piqueras *et al.*, 1992). La reducción en la actividad de la membrana plasmática, fue descrita por los procesos endocíticos en cultivos de astrocitos (Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2004) y también con cultivo de neuronas (Marín *et al.*, 2010). Al mismo tiempo, estudios previos, han indicado que la sacarosa, un inhibidor de la endocitosis dependiente de clatrina, reduce la captación de zinc por los astrocitos, sugiriendo que la endocitosis del zinc podría estar mediada por clatrina (Varea *et al.*, 2006). Alternativamente, el etanol puede afectar a las enzimas que participan en la fusión de

vesículas (ATPasas, GTPasas...) mediante la alteración de las funciones como la Rab GTPasa, las cuales parecen participar como reguladores específicos del transporte y la fusión de membrana (Novick and Zerial, 1997).

Está claro cómo el etanol afecta a todos estos procesos de transporte intracelular, y está ampliamente aceptado que el acetaldehído, el primer producto del metabolismo del etanol en el hígado, puede poner en peligro el transporte de vesículas mediante la interrupción en la polimerización de los microtúbulos (Yoon *et al.*, 1998). Aunque no existan evidencias que apoyen esta hipótesis con respecto al hígado (Smith *et al.*, 1992), éste no puede ser el único mecanismo implicado en el efecto del etanol sobre el citoesqueleto, porque las células astrogiales tienen una baja capacidad para metabolizar el etanol, y la producción de acetaldehído en estas células es muy bajo en comparación con los hepatocitos (Eysseric *et al.*, 1997). Este proceso de captación de zinc depende de la integridad tanto de los microtúbulos, como del citoesqueleto de actina, como de los filamentos intermedios, incluyendo GFAP y neurofilamentos, y que están claramente afectados, junto con el proceso de endocitosis, por la exposición crónica de los astrocitos al etanol (Marín *et al.*, 2008; Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2004, 2005; Reis *et al.*, 2015). Por lo tanto, este efecto nocivo del etanol podría estar implicado en la disminución de zinc en los astrocitos expuestos a alcohol, siendo menos notables a tiempos cortos y magnificándose las diferencias con tiempos de incubación más largos. Además, el citoesqueleto es una conocida diana del zinc en la célula, especialmente en los microtúbulos, y se ha propuesto que la dinámica de los microtúbulos también pueda estar afectada por los bajos niveles de zinc celulares (Hesketh, 1982; Mackenzie *et al.*, 2006, 2007).

4.2 Efectos del modelo de síndrome de Down.

En esta tesis se han estudiado los efectos del SD y del SAF en el modelo celular *in vitro* de los astrocitos, es este caso Ts65Dn (Davisson *et al.*, 1990). El SD es la alteración genética más común asociada típicamente a la discapacidad intelectual. La característica más común entre todos los individuos con la trisomía del cromosoma 21 es la presencia de discapacidad intelectual, que puede ir desde leve hasta moderada. El metabolismo del zinc está alterado en individuos con SD (Lima *et al.*, 2010). Estudios anteriores han demostrado una alteración en la homeostasis del zinc en personas con SD. Se ha detectado una reducción en los niveles de zinc en plasma y orina de niños con SD (Lima *et al.*, 2010). En adolescentes también se encuentra alterado el balance de zinc, siendo la concentración de zinc en plasma y orina menor en individuos con SD (Marques *et al.*, 2007). También se ha visto una disminución significativa en la concentración de zinc en el cabello de individuos con SD, utilizado como un indicador fiable que refleja el estado nutricional del individuo (Yenigun *et al.*, 2004).

En esta tesis, hemos observado una alteración en la distribución de zinc basal en los astrocitos de ratones trisómicos. En condiciones basales hay una reducción en la concentración de zinc iónico de alrededor del 20% en los astrocitos de ratones trisómicos (figura 68) (Ballestín *et al.*, 2014). Los bajos niveles de zinc se han relacionado con diferentes anomalías, tanto fisiológicas como del desarrollo, y en algunos casos relacionados con las capacidades mentales (Sandstead, 2000). En consecuencia, dado que los astrocitos controlan las barreras del sistema nervioso central, parece razonable proponer que la entrada de zinc y la biodisponibilidad de las neuronas podría verse afectada en ratones trisómicos en comparación con los controles.

Curiosamente, a diferencia de lo que hemos observado con etanol, encontramos un mayor número de zincosomas marcados en el citosol de los astrocitos trisómicos (figura 70), pero con una disminución en la cantidad total de zinc intracelular (figura 69). También hemos visto que la función endocítica de astrocitos trisómicos permanece inalterada (figura 71), como se mostró anteriormente en diferentes tipos de células de los modelos de SD (Cataldo *et al.*, 2003). Por lo tanto, otro mecanismo tiene que ser el responsable de la baja concentración de zinc iónico en los astrocitos trisómicos respecto a las células control. Por otro lado, la mayor cantidad de zincosomas en condiciones basales en el citosol de astrocitos procedentes de crías Ts65Dn, podría reflejar también un deterioro en el tráfico intracelular de zinc. Posiblemente relacionado con la alteración en el sistema de microtúbulos de los ratones Ts65Dn descrito previamente (Liu *et al.*, 2008). Los astrocitos de ratones trisómicos pueden tener problemas para gestionar el zinc iónico capturado, por lo que la presencia de zincosomas en astrocitos sin pulso de zinc exógeno, puede reflejar una alteración o un procesamiento más lento del zinc iónico capturado del medio extracelular.

El calcio, otro catión divalente que comparte muchos canales iónicos con el zinc, ha sido anteriormente estudiado en astrocitos de ratones Ts65Dn (Bambrick *et al.*, 2003) mostrando un nivel de calcio citosólico en reposo más alto que el control. Se obtuvieron resultados similares en el modelo murino de síndrome de Down Ts16 (Bambrick *et al.*, 1997). La desregulación de calcio refleja alteraciones en los canales y bombas iónicas, y los sistemas intracelulares de homeostasis de calcio, y probablemente, los niveles de zinc iónicos también se ven afectados por esta alteración (Kim *et al.*, 2000).

4.3 Efectos de las metalotioneínas en modelos de SAF y SD.

Un elemento importante a la hora de mantener la homeostasis del zinc es la presencia de metalotioneínas (MT). Son proteínas de bajo peso molecular y con un alto contenido en grupos sulfhidrilo de aminoácidos cisteína (Ebadi *et al.*, 1995). El grupo sulfhidrilo de la cisteína puede unir átomos de metales esenciales (zinc y cobre), y no esenciales (cadmio, plomo, oro y

mercurio) (Kägi y Kojima, 1987). Se encuentran en todos los tejidos de los mamíferos, en el SNC se han encontrado tanto en astrocitos como en neuronas. A nivel celular, las MT se localizan principalmente en el citoplasma, aunque también se han encontrado en el interior de lisosomas y en el núcleo celular (Blaauwgeers *et al.*, 1993; Hidalgo *et al.*, 1994). Existen varias isoformas de estas proteínas, siendo las metalotioneínas 1 y 2 las que se expresan de forma ubicua. La metalotioneína 3 se aisló inicialmente en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Uchida *et al.*, 1991), se caracterizó inicialmente por su acción inhibitoria sobre la extensión de neuritas y fue nombrado “factor inhibitorio del crecimiento neural” (Palmiter *et al.*, 1992), y se localiza específicamente en el cerebro. Esta metalotioneína parece ser la más importante en la homeostasis del zinc en las neuronas que poseen zinc vesicular (Masters *et al.*, 1994). Y la metalotioneína 4 se encuentra en tejidos córneos estratificados y escamosos de la piel.

Las funciones de las MT dependen en gran medida del metal al que se unan. En el caso del zinc (que es un metal menos reactivo y tóxico que el cobre y el cadmio), su función sería la de contener iones zinc unido lábilmemente, dadas las bajas constantes de afinidad de las MT por el zinc (Krezel y Maret, 2007), para ser utilizado cuando sea necesario, ya sea en la activación de enzimas en procesos de anabolismo y catabolismo, o en la transferencia de información genética. Además, tienen un papel importante en la captura e inactivación de radicales libres, y en la modulación de la expresión genética transfiriendo o eliminando iones zinc de los varios factores de transcripción provocando la activación o inactivación de procesos génicos.

En el modelo de SAF se ha visto que la administración crónica o aguda de etanol puede causar la generación de ROS y estrés oxidativo en el cerebro (Goodlett y Horn, 2001). Esta generación de radicales libres, es una de las causas del daño celular tras la administración del etanol. Como consecuencia del estrés oxidativo causado por la administración oral del etanol o de sus metabolitos (Goodlett y Horn, 2001), el cerebro podría poner en marcha un mecanismo de inducción de metalotioneínas, considerado como un mecanismo protector contra la toxicidad por etanol (Suzuki y Cherian, 2000). El etanol puede inducir un aumento importante en los niveles de metalotioneínas, siendo el incremento de 10 veces en cerebro, 1,5 veces en riñones y 3,5 veces en hígado (Floriańczyk, 2001). Se ha observado que el aumento afecta fundamentalmente a la metalotioneína 2 (Loney *et al.*, 2003). Los genes de las metalotioneínas poseen en sus promotores varios elementos de respuesta a metales, los denominados elementos regulados por metal (MRE) (Searle *et al.*, 1984), a estos elementos se les une el factor de transcripción sensible a metales del tipo 1 (MTF-1) que es una proteína regulada por metales (MRP) (Radtke *et al.*, 1993). Otro elemento que promueve la transcripción de las MT es el elemento de respuesta antioxidante (ARE), en respuesta a sustancias oxidantes como las ROS (Dalton *et al.*, 1994). Existen factores fisiológicos que han mostrado ser inductores de la síntesis

de las MT, como el etanol, los glucocorticoides, el glucagón, las IL-1 y 6, la diabetes, etc. Este aumento en la expresión de metalotioneínas, provocaría un secuestro de parte del zinc iónico generando un descenso en la concentración intracelular de zinc basal encontrada en astrocitos tratados con etanol (figura 61).

En individuos con SD se ha observado una sobreexpresión de la metalotioneína 3 (Arai *et al.*, 1997). Las metalotioneínas tienen la capacidad de secuestrar zinc y reducir la concentración de zinc iónico libre (Malaiyandi *et al.*, 2004 y Paski *et al.*, 2003). El exceso de MT-3 en SD podría provocar un descenso en la concentración de zinc iónico libre, similar al efecto que tendría el exceso de MT-2 en SAF. Dado que esta proteína se caracterizó inicialmente por su acción inhibidora sobre la extensión de neuritas, es previsible que el exceso de MT-3 esté relacionado con la atrofia dendrítica observada en las neuronas de individuos y modelos murinos de SD en muchas regiones del cerebro (Dierssen *et al.*, 2003). Hemos encontrado que los niveles de MT-3 fueron más altos en el citosol de astrocitos trisómicos que en los astrocitos controles (figura 72) de acuerdo con las observaciones de Arai *et al.*, 1997 en otros tipos celulares.

La hipótesis de que el exceso de MTs pueda inducir un descenso en la concentración de zinc fue confirmada posteriormente mediante el bloqueo de la expresión de una de ellas, la MT-3, utilizando un ARN de interferencia (siARN), este ARN bloquea al ARN mensajero correspondiente. Con este tratamiento se redujo la expresión de la MT-3 (figura 75) y como consecuencia, se observa un aumento de la concentración citoplasmática de zinc en los astrocitos (figura 74). Por lo tanto, un exceso de MTs como la MT-3, podría explicar, al menos en parte, la reducción de zinc libre observada en astrocitos Ts65Dn, y de igual modo, es de esperar que el bloqueo de MT-2 provoque un efecto similar en el SAF.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El fluorocromo TSQ es el marcador más apropiado para el estudio con epifluorescencia de la captura y almacenamiento de zinc en forma de zincosomas en cultivos primarios de astrocitos, dada su capacidad de llegar a todos los compartimentos celulares; a diferencia de otros fluorocromos como el FluoZin-3 AM y el Newport Green DCF que sólo llegan a marcar el citoplasma.
2. Las condiciones más apropiadas para el estudio de captación de zinc con fluorescencia en astrocitos en cultivo fueron la combinación de: una incubación con TPEN para eliminar el zinc iónico presente en las células, un pulso de 50 μM de zinc exógeno durante 10 minutos y una incubación de 10 minutos con el fluorocromo TSQ.

texto suprimido para permitir el proceso de tramitación de patentes

4. La caracterización de los zincosomas mediante microscopía electrónica de transmisión nos muestra las vesículas, previamente marcadas con TSQ o ditizona, aparentemente vacías. Sólo se observó el contenido de las vesículas mediante los métodos de precipitación y amplificación tanto con plata como con osmio. Estas vesículas tienen su origen en el zinc extracelular capturado por vía endocítica. Las vesículas, inicialmente de pequeño tamaño, se van fusionando para generar compartimentos maduros.
5. Los astrocitos del modelo de SAF, presentan una reducción en los niveles intracelulares de zinc basales y en la capacidad de captación de zinc exógeno. Alterando del mismo modo la formación, distribución y densidad de los zincosomas.
6. Los astrocitos del modelo de SD, en condiciones basales muestran una menor concentración de zinc intracelular y una mayor densidad de zincosomas en comparación con los controles. Sin embargo, estos astrocitos presentan la función endocítica inalterada, así como la capacidad de capturar zinc iónico extracelular.
7. El incremento en la concentración de metalotioneínas en estos modelos se correlaciona con un descenso en el zinc basal observado. La reducción en la concentración de metalotioneínas, mediante el uso de ARN de silenciamiento, induce incremento en la concentración de zinc iónico en el citoplasma de los astrocitos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abass, K., Saad, H., & Abd-Elseyed, A. A. (2009). The first case of isolated facial cutaneous leishmaniasis in a Down syndrome infant: a case report and review of the literature. *Cases Journal*, 2(1), 13. doi:10.1186/1757-1626-2-13
- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. doi:10.1038/nrn1824
- Abel, E. L. (1997). Maternal alcohol consumption and spontaneous abortion. *Alcohol and Alcoholism*, 32(3), 211–219.
- Ackland, M. L., & Mercer, J. F. (1992). The murine mutation, lethal milk, results in production of zinc-deficient milk. *The Journal of Nutrition*, 122(6), 1214–1218.
- Adlard, P. A., Parncutt, J., Lal, V., James, S., Hare, D., Doble, P., *et al.* (2014). Metal chaperones prevent zinc-mediated cognitive decline. *Neurobiology of Disease*. doi:10.1016/j.nbd.2014.12.012
- Akaike, N., Kanaide, H., Kuga, T., Nakamura, M., Sadoshima, J., & Tomoike, H. (1989). Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *The Journal of Physiology*, 416, 141–160.
- Alati, R., Al Mamun, A., Williams, G. M., O’Callaghan, M., Najman, J. M., & Bor, W. (2006). In utero alcohol exposure and prediction of alcohol disorders in early adulthood: a birth cohort study. *Archives of General Psychiatry*, 63(9), 1009–1016. doi:10.1001/archpsyc.63.9.1009
- Albertsen, K., Andersen, A.-M. N., Olsen, J., & Grønbaek, M. (2004). Alcohol consumption during pregnancy and the risk of preterm delivery. *American Journal of Epidemiology*, 159(2), 155–61.
- Alio, J. J., Lorenzo, J., & Iglesias, C. (2008). Cranial base growth in patients with Down syndrome: a longitudinal study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 133(5), 729–737. doi:10.1016/j.ajodo.2006.03.036
- Allanson, J. E., O’Hara, P., Farkas, L. G., & Nair, R. C. (1993). Anthropometric craniofacial pattern profiles in Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 47(5), 748–752. doi:10.1002/ajmg.1320470530
- Allen, N. J., & Barres, B. A. (2005). Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5), 542–548. doi:10.1016/j.conb.2005.08.006
- Altura, B. M., Altura, B. T., Carella, A., Chatterjee, M., Halevy, S., & Tejani, N. (1982). Alcohol produces spasms of human umbilical blood vessels: relationship to fetal alcohol syndrome (FAS). *European Journal of Pharmacology*, 86(2), 311–312.
- Amedee, T., Robert, A., & Coles, J. A. (1997). Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia*, 21(1), 46–55.
- Anderson, P. & Baumberg, B. (2006) Alcohol in Europe. London: Institute of Alcohol Studies.
- Andrews, J. C., Nolan, J. P., Hammerstedt, R. H., & Bavister, B. D. (1995). Characterization of N-(6-methoxy-8-quinolyl)-p-toluenesulfonamide for the detection of zinc in living sperm cells. *Cytometry*, 21(2), 153–159. doi:10.1002/cyto.990210207
- Andrews, N. C. (1999). The iron transporter DMT1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10), 991–4.
- Antonarakis, S. E., & Epstein, C. J. (2006). The challenge of Down syndrome. *Trends in*

- Molecular Medicine*, 12(10), 473–479. doi:10.1016/j.molmed.2006.08.005
- Arai, Y., Uchida, Y., & Takashima, S. (1997). Developmental immunohistochemistry of growth inhibitory factor in normal brains and brains of patients with Down syndrome. *Pediatric Neurology*, 17(2), 134–138.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208–215.
- Archibald, S. L., Fennema-Notestine, C., Gamst, A., Riley, E. P., Mattson, S. N., & Jernigan, T. L. (2001). Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 43(3), 148–154.
- Arends, M. J., White, E. S., & Whitelaw, C. B. A. (2015). Animal and cellular models of human disease. *The Journal of Pathology*. doi:10.1002/path.4662
- Auld, D. S., & Robitaille, R. (2003). Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron*, 40(2), 389–400.
- Austin, J. H., Preger, L., Siris, E., & Taybi, H. (1969). Short hard palate in newborn: roentgen sign of mongolism. *Radiology*, 92(4), 775–6. doi:10.1148/92.4.775
- Autti-Ramo, I., Autti, T., Korkman, M., Kettunen, S., Salonen, O., & Valanne, L. (2002). MRI findings in children with school problems who had been exposed prenatally to alcohol. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 44(2), 98–106.
- Azman, B. Z., Ankathil, R., Siti Mariam, I., Suhaida, M. A., Norhashimah, M., Tarmizi, A. B., *et al.* (2007). Cytogenetic and clinical profile of Down syndrome in Northeast Malaysia. *Singapore Medical Journal*, 48(6), 550–554.
- Backman, B., Grever-Sjolander, A.-C., Bengtsson, K., Persson, J., & Johansson, I. (2007). Children with Down syndrome: oral development and morphology after use of palatal plates between 6 and 48 months of age. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 17(1), 19–28. doi:10.1111/j.1365-263X.2006.00781.x
- Bagic, I., & Verzak, Z. (2003). Craniofacial anthropometric analysis in Down's syndrome patients. *Collegium Antropologicum*, 27 Suppl 2, 23–30.
- Ball, M. J., & Nuttall, K. (1980). Neurofibrillary tangles, granulovacuolar degeneration, and neuron loss in Down Syndrome: quantitative comparison with Alzheimer dementia. *Annals of Neurology*, 7(5), 462–465. doi:10.1002/ana.410070512
- Ballestin, R., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., Nacher, J., Lopez-Hidalgo, R., Gilabert-Juan, J., *et al.* (2014). Astrocytes of the murine model for Down Syndrome Ts65Dn display reduced intracellular ionic zinc. *Neurochemistry International*, 75, 48–53. doi:10.1016/j.neuint.2014.05.013
- Ballestin, R., Molowny, A., Marin, M. P., Esteban-Pretel, G., Romero, A. M., Lopez-Garcia, C., *et al.* (2011). Ethanol reduces zincosome formation in cultured astrocytes. *Alcohol and Alcoholism*, 46(1), 17–25. doi:10.1093/alcalc/agg079
- Bambrick, L. L., Golovina, V. A., Blaustein, M. P., Yarowsky, P. J., & Krueger, B. K. (1997). Abnormal calcium homeostasis in astrocytes from the trisomy 16 mouse. *Glia*, 19(4), 352–358.
- Bambrick, L. L., Yarowsky, P. J., & Krueger, B. K. (2003). Altered astrocyte calcium homeostasis and proliferation in the Ts65Dn mouse, a model of Down syndrome. *Journal of Neuroscience Research*, 73(1), 89–94. doi:10.1002/jnr.10630

- Barr, H. M., & Streissguth, A. P. (2001). Identifying maternal self-reported alcohol use associated with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 25(2), 283–287.
- Bastian, C., & Li, Y. V. (2007). Fluorescence imaging study of extracellular zinc at the hippocampal mossy fiber synapse. *Neuroscience Letters*, 419(2), 119–124. doi:10.1016/j.neulet.2007.04.047
- Bauer, M. C., Nilsson, H., Thulin, E., Frohm, B., Malm, J., & Linse, S. (2008). Zn²⁺ binding to human calbindin D(28k) and the role of histidine residues. *Protein Science*, 17(4), 760–767. doi:10.1110/ps.073381108
- Baxter, L. L., Moran, T. H., Richtsmeier, J. T., Troncoso, J., & Reeves, R. H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Human Molecular Genetics*, 9(2), 195–202.
- Bearer, C. F. (2001). Markers to detect drinking during pregnancy. *Alcohol Research & Health*, 25(3), 210–218.
- Bearer, C. F., Swick, A. R., O’Riordan, M. A., & Cheng, G. (1999). Ethanol inhibits L1-mediated neurite outgrowth in postnatal rat cerebellar granule cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13264–13270.
- Bell, S. G., & Vallee, B. L. (2009). The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. *Chembiochem*, 10(1), 55–62. doi:10.1002/cbic.200800511
- Bersu, E. T. (1980). Anatomical analysis of the developmental effects of aneuploidy in man: the Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 5(4), 399–420. doi:10.1002/ajmg.1320050411
- Beyersmann, D., & Haase, H. (2001). Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, 14(3-4), 331–341.
- Bezzi, P., & Volterra, A. (2001). A neuron-glia signalling network in the active brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(3), 387–394.
- Bhatara, V. S., Lovrein, F., Kirkeby, J., Swayze, V. 2nd, Unruh, E., & Johnson, V. (2002). Brain function in fetal alcohol syndrome assessed by single photon emission computed tomography. *South Dakota Journal of Medicine*, 55(2), 59–62.
- Bhave, S. V., & Hoffman, P. L. (1997). Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. *Journal of Neurochemistry*, 68(2), 578–586.
- Bilbo, S. D., & Schwarz, J. M. (2009). Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, 14. doi:10.3389/neuro.08.014.2009
- Bishop, G. M., Scheiber, I. F., Dringen, R., & Robinson, S. R. (2010). Synergistic accumulation of iron and zinc by cultured astrocytes. *Journal of Neural Transmission*, 117(7), 809–817. doi:10.1007/s00702-010-0420-9
- Bitanhirwe, B. K. Y., & Cunningham, M. G. (2009). Zinc: the brain’s dark horse. *Synapse*, 63(11), 1029–1049. doi:10.1002/syn.20683
- Bittles, A. H., Bower, C., Hussain, R., & Glasson, E. J. (2007). The four ages of Down syndrome. *European Journal of Public Health*, 17(2), 221–225. doi:10.1093/eurpub/ckl103
- Bittles, A. H., & Glasson, E. J. (2004). Clinical, social, and ethical implications of changing life expectancy in Down syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 46(4),

282–286.

- Blaauwgeers, H. G., Sillevs Smitt, P. A., De Jong, J. M., & Troost, D. (1993). Distribution of metallothionein in the human central nervous system. *Glia*, 8(1), 62–70. doi:10.1002/glia.440080108
- Blazek, J. D., Gaddy, A., Meyer, R., Roper, R. J., & Li, J. (2011). Disruption of bone development and homeostasis by trisomy in Ts65Dn Down syndrome mice. *Bone*, 48(2), 275–280. doi:10.1016/j.bone.2010.09.028
- Bolognin, S., Drago, D., Messori, L., & Zatta, P. (2009). Chelation therapy for neurodegenerative diseases. *Medicinal Research Reviews*, 29(4), 547–570. doi:10.1002/med.20148
- Bonthius, D. J., Karacay, B., Dai, D., Hutton, A., & Pantazis, N. J. (2004). The NO-cGMP-PKG pathway plays an essential role in the acquisition of ethanol resistance by cerebellar granule neurons. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(1), 47–57. doi:10.1016/j.ntt.2003.08.004
- Bookstein, F. L., Streissguth, A. P., Sampson, P. D., Connor, P. D., & Barr, H. M. (2002). Corpus callosum shape and neuropsychological deficits in adult males with heavy fetal alcohol exposure. *NeuroImage*, 15(1), 233–251. doi:10.1006/nimg.2001.0977
- Bosomworth, H. J., Adlard, P. A., Ford, D., & Valentine, R. A. (2013). Altered expression of ZnT10 in Alzheimer's disease brain. *PloS One*, 8(5), e65475. doi:10.1371/journal.pone.0065475
- Bossy-Wetzel, E., Talantova, M. V., Lee, W. D., Scholzke, M. N., Harrop, A., Mathews, E., *et al.* (2004). Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron*, 41(3), 351–365.
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 37–53. doi:10.1007/s00401-009-0601-5
- Bradley, K. A., Badrinath, S., Bush, K., Boyd-Wickizer, J., & Anawalt, B. (1998). Medical risks for women who drink alcohol. *Journal of General Internal Medicine*, 13(9), 627–639.
- Braza-Boils, A., Tomas, M., Marin, M. P., Megias, L., Sancho-Tello, M., Fornas, E., & Renau-Piqueras, J. (2006). Glycosylation is altered by ethanol in rat hippocampal cultured neurons. *Alcohol and Alcoholism*, 41(5), 494–504. doi:10.1093/alcalc/agl044
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of Neuroscience Research*, 35(5), 567–576. doi:10.1002/jnr.490350513
- Bucci, I., Napolitano, G., Giuliani, C., Lio, S., Minnucci, A., Di Giacomo, F., *et al.* (1999). Zinc sulfate supplementation improves thyroid function in hypozincemic Down children. *Biological Trace Element Research*, 67(3), 257–268.
- Budde, T., Minta, A., White, J. A., & Kay, A. R. (1997). Imaging free zinc in synaptic terminals in live hippocampal slices. *Neuroscience*, 79(2), 347–58.
- Bush, A. I., Pettingell, W. H., Multhaup, G., d Paradis, M., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., *et al.* (1994). Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc. *Science*, 265(5177), 1464–1467.
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *The Journal of*

- Neuroscience*, 22(1), 183–192.
- Butt, A. M., Duncan, A., & Berry, M. (1994). Astrocyte associations with nodes of Ranvier: ultrastructural analysis of HRP-filled astrocytes in the mouse optic nerve. *Journal of Neurocytology*, 23(8), 486–499.
- Byard, R. W. (2007). Forensic issues in Down syndrome fatalities. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 14(8), 475–481. doi:10.1016/j.jflm.2007.01.001
- Cabantchik, Z. I., Glickstein, H., Milgram, P., & Breuer, W. (1996). A fluorescence assay for assessing chelation of intracellular iron in a membrane model system and in mammalian cells. *Analytical Biochemistry*, 233(2), 221–227. doi:10.1006/abio.1996.0032
- Canzoniero, L. M., Sensi, S. L., & Choi, D. W. (1997). Measurement of intracellular free zinc in living neurons. *Neurobiology of Disease*, 4(3-4), 275–279. doi:10.1006/nbdi.1997.0160
- Canzoniero, L. M. T., Manzerra, P., Sheline, C. T., & Choi, D. W. (2003). Membrane-permeant chelators can attenuate Zn²⁺-induced cortical neuronal death. *Neuropharmacology*, 45(3), 420–428.
- Carey, L. C., Coyle, P., Philcox, J. C., & Rofe, A. M. (2000). Ethanol decreases zinc transfer to the fetus in normal but not metallothionein-null mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 24(8), 1236–1240.
- Carey, L. C., Coyle, P., Philcox, J. C., & Rofe, A. M. (2003). Zinc supplementation at the time of ethanol exposure ameliorates teratogenicity in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 27(1), 107–110. doi:10.1097/01.ALC.0000046337.19144.7D
- Carlstedt, K., Anneren, G., Huggare, J., Modeer, T., & Dahllof, G. (1999). The effect of growth hormone therapy on craniofacial growth and dental maturity in children with Down syndrome. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 19(1), 20–23.
- Cataldo, A. M., Petanceska, S., Peterhoff, C. M., Terio, N. B., Epstein, C. J., Villar, A., *et al.* (2003). App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of down syndrome. *The Journal of Neuroscience*, 23(17), 6788–6792.
- Ceccanti, M., Alessandra Spagnolo, P., Tarani, L., Luisa Attilia, M., Chessa, L., Mancinelli, R., *et al.* (2007). Clinical delineation of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) in Italian children: comparison and contrast with other racial/ethnic groups and implications for diagnosis and prevention. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(2), 270–277. doi:10.1016/j.neubiorev.2006.06.024
- Chang, C.-Y., Ou, Y.-C., Kao, T.-K., Pan, H.-C., Lin, S.-Y., Liao, S.-L., *et al.* (2010). Glucose exacerbates zinc-induced astrocyte death. *Toxicology Letters*, 199(1), 102–109. doi:10.1016/j.toxlet.2010.08.012
- Chen, C.-J., & Liao, S.-L. (2003). Neurotrophic and neurotoxic effects of zinc on neonatal cortical neurons. *Neurochemistry International*, 42(6), 471–479.
- Chen, S. Y., & Sulik, K. K. (1996). Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 20(6), 1071–1076.
- Chen, W. J., Berryhill, E. C., & West, J. R. (2001). Zinc supplementation does not attenuate alcohol-induced cerebellar Purkinje cell loss during the brain growth spurt period. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 25(4), 600–605.
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., *et al.*

- (2001). Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron*, *30*(3), 665–676.
- Chowanadisai, W., Graham, D. M., Keen, C. L., Rucker, R. B., & Messerli, M. A. (2013). Neurulation and neurite extension require the zinc transporter ZIP12 (slc39a12). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(24), 9903–9908. doi:10.1073/pnas.1222142110
- Christine, C. W., & Choi, D. W. (1990). Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, *10*(1), 108–116.
- Chumlea, W. C., Malina, R. M., Rarick, G. L., & Seefeldt, V. D. (1979). Growth of short bones of the hand in children with Down's syndrome. *Journal of Mental Deficiency Research*, *23*(2), 137–150.
- Clark, C. M., Li, D., Conry, J., Conry, R., & Looock, C. (2000). Structural and functional brain integrity of fetal alcohol syndrome in nonretarded cases. *Pediatrics*, *105*(5), 1096–1099.
- Clarren, S. K. (1981). Recognition of fetal alcohol syndrome. *JAMA Internal Medicine*, *245*(23), 2436–2439.
- Clarren, S. K., Alvord, E. C. J., Sumi, S. M., Streissguth, A. P., & Smith, D. W. (1978). Brain malformations related to prenatal exposure to ethanol. *The Journal of Pediatrics*, *92*(1), 64–67.
- Climent, E., Pascual, M., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (2002). Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *Journal of Neuroscience Research*, *68*(2), 213–225.
- Coffin, J. M., Barody, S., Schneider, K., & O'Neill, J. (2005). Impaired cerebellar learning in children with prenatal alcohol exposure: a comparative study of eyeblink conditioning in children with ADHD and dyslexia. *Cortex*, *41*(3), 389–398.
- Cole, T. B., Martyanova, A., & Palmiter, R. D. (2001). Removing zinc from synaptic vesicles does not impair spatial learning, memory, or sensorimotor functions in the mouse. *Brain Research*, *891*(1-2), 253–265.
- Cole, T. B., Robbins, C. A., Wenzel, H. J., Schwartzkroin, P. A., & Palmiter, R. D. (2000). Seizures and neuronal damage in mice lacking vesicular zinc. *Epilepsy Research*, *39*(2), 153–169.
- Cole, T. B., Wenzel, H. J., Kafer, K. E., Schwartzkroin, P. A., & Palmiter, R. D. (1999). Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(4), 1716–1721.
- Coleman, J. E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *61*, 897–946. doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.004341
- Coles, C. D., Platzman, K. A., Lynch, M. E., & Freides, D. (2002). Auditory and visual sustained attention in adolescents prenatally exposed to alcohol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *26*(2), 263–271.
- Collacott, R. A. (1993). Epilepsy, dementia and adaptive behaviour in Down's syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, *37* (Pt 2), 153–160.
- Colombo, J. A., Napp, M. I., Yanez, A., & Reisin, H. (2001). Tissue printing of astroglial

- interlaminar processes from human and non-human primate cerebral cortex. *Brain research bulletin* (Vol. 55). United States.
- Colombo, J. A., Yanez, A., Puissant, V., & Lipina, S. (1995). Long, interlaminar astroglial cell processes in the cortex of adult monkeys. *Journal of Neuroscience Research*, 40(4), 551–556. doi:10.1002/jnr.490400414
- Colvin, R. A. (1998a). Characterization of a plasma membrane zinc transporter in rat brain. *Neuroscience Letters*, 247(2-3), 147–150.
- Colvin, R. A. (1998b). Zinc inhibits Ca²⁺ transport by rat brain NA⁺/Ca²⁺ exchanger. *Neuroreport*, 9(13), 3091–3096.
- Colvin, R. A., Holmes, W. R., Fontaine, C. P., & Maret, W. (2010). Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2(5), 306–317. doi:10.1039/b926662c
- Colvin, R. A., Laskowski, M., & Fontaine, C. P. (2006). Zinquin identifies subcellular compartmentalization of zinc in cortical neurons. Relation to the trafficking of zinc and the mitochondrial compartment. *Brain Research*, 1085(1), 1–10. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.043
- Connor, P. D., Streissguth, A. P., Sampson, P. D., Bookstein, F. L., & Barr, H. M. (1999). Individual differences in auditory and visual attention among fetal alcohol-affected adults. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 23(8), 1395–1402.
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., *et al.* (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus*, 17(8), 665–678. doi:10.1002/hipo.20308
- Cornett, C. R., Markesbery, W. R., & Ehmann, W. D. (1998). Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology*, 19(3), 339–345.
- Costa, A. C., Walsh, K., & Davisson, M. T. (1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiology & Behavior*, 68(1-2), 211–220.
- Cousins, R. J. (1994). Metal elements and gene expression. *Annual Review of Nutrition*, 14, 449–469. doi:10.1146/annurev.nu.14.070194.002313
- Coyle, P., Martin, S. A., Carey, L. C., Summers, B. L., & Rofe, A. M. (2009). Ethanol-mediated fetal dysmorphology and its relationship to the ontogeny of maternal liver metallothionein. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(6), 1051–1058. doi:10.1111/j.1530-0277.2009.00926.x
- Cudd, T. A. (2005). Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 389–393.
- Cui, S. J., Tewari, M., Schneider, T., & Rubin, R. (1997). Ethanol promotes cell death by inhibition of the insulin-like growth factor I receptor. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 21(6), 1121–1127.
- Dagklis, T., Borenstein, M., Peralta, C. F. A., Faro, C., & Nicolaides, K. H. (2006). Three-dimensional evaluation of mid-facial hypoplasia in fetuses with trisomy 21 at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 28(3), 261–265. doi:10.1002/uog.2841
- Dalton, T. P., He, L., Wang, B., Miller, M. L., Jin, L., Stringer, K. F., *et al.* (2005). Identification

- of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3401–3406. doi:10.1073/pnas.0406085102
- Dalton, T., Palmiter, R. D., & Andrews, G. K. (1994). Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Research*, 22(23), 5016–5023.
- Dalton, T., Paria, B. C., Fernando, L. P., Huet-Hudson, Y. M., Dey, S. K., & Andrews, G. K. (1997). Activation of the chicken metallothionein promoter by metals and oxidative stress in cultured cells and transgenic mice. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 116(1), 75–86.
- Danscher, G. (1981). Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry*, 71(1), 1–16.
- Danscher, G. (1982). Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry*, 76(3), 281–293.
- Danscher, G. (1984). Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissues (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochemistry*, 81(4), 331–335.
- Danscher, G., Jensen, K. B., Frederickson, C. J., Kemp, K., Andreasen, A., Juhl, S., *et al.* (1997). Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's diseased brains: a proton-induced X-ray emission spectroscopic analysis of cryostat sections from autopsy material. *Journal of Neuroscience Methods*, 76(1), 53–59.
- Danscher, G., Jo, S. M., Varea, E., Wang, Z., Cole, T. B., & Schroder, H. D. (2001). Inhibitory zinc-enriched terminals in mouse spinal cord. *Neuroscience*, 105(4), 941–947.
- Danscher, G., & Stoltenberg, M. (2005). Zinc-specific autometallographic in vivo selenium methods: tracing of zinc-enriched (ZEN) terminals, ZEN pathways, and pools of zinc ions in a multitude of other ZEN cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(2), 141–153. doi:10.1369/jhc.4R6460.2005
- Danscher, G., & Stoltenberg, M. (2006). Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 41(2), 57–139. doi:10.1016/j.proghi.2006.06.001
- Danscher, G., Stoltenberg, M., & Juhl, S. (1994). How to detect gold, silver and mercury in human brain and other tissues by autometallographic silver amplification. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 20(5), 454–467.
- Danscher, G., Thorlacius-Ussing, O., Rungby, J., & Moller-Madsen, B. (1985). Selenium in the Paneth cells. *The Science of the Total Environment*, 42(1-2), 189–192.
- Danscher, G., & Zimmer, J. (1978). An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry*, 55(1), 27–40.

- Davisson, M. T., Schmidt, C., & Akeson, E. C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Progress in Clinical and Biological Research*, 360, 263–280.
- Davisson, M. T., Schmidt, C., Reeves, R. H., Irving, N. G., Akeson, E. C., Harris, B. S., & Bronson, R. T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Progress in Clinical and Biological Research*, 384, 117–33.
- de Reuck, J., & Vanderdonckt, P. (1986). Choroid plexus and ependymal cells in CSF cytology. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 88(3), 177–179.
- Deitmer, J. W. (2000). Glial strategy for metabolic shuttling and neuronal function. *BioEssays*, 22(8), 747–752. doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<747:AID-BIES8>3.0.CO;2-0
- Deitmer, J. W., Verkhratsky, A. J., & Lohr, C. (1998). Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium*, 24(5-6), 405–416.
- Delabar, J. M., Aflalo-Rattenbac, R., & Creau, N. (2006). Developmental defects in trisomy 21 and mouse models. *The Scientific World Journal*, 6, 1945–1964. doi:10.1100/tsw.2006.322
- Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., et al. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*, 1(2), 114–124.
- Deltour, L., Ang, H. L., & Duester, G. (1996). Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(9), 1050–1057.
- Demas, G. E., Nelson, R. J., Krueger, B. K., & Yarowsky, P. J. (1996). Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behavioural Brain Research*, 82(1), 85–92.
- Demas, G. E., Nelson, R. J., Krueger, B. K., & Yarowsky, P. J. (1998). Impaired spatial working and reference memory in segmental trisomy (Ts65Dn) mice. *Behavioural Brain Research*, 90(2), 199–201.
- Dierssen, M., Benavides-Piccione, R., Martinez-Cue, C., Estivill, X., Florez, J., Elston, G. N., & DeFelipe, J. (2003). Alterations of neocortical pyramidal cell phenotype in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome: effects of environmental enrichment. *Cerebral Cortex*, 13(7), 758–764.
- Dierssen, M., & Ramakers, G. J. A. (2006). Dendritic pathology in mental retardation: from molecular genetics to neurobiology. *Genes, Brain, and Behavior*, 5 Suppl 2, 48–60. doi:10.1111/j.1601-183X.2006.00224.x
- Dikranian, K., Qin, Y.-Q., Labruyere, J., Nemmers, B., & Olney, J. W. (2005). Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 155(1), 1–13. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.11.005
- Dineley, K. E., Malaiyandi, L. M., & Reynolds, I. J. (2002). A reevaluation of neuronal zinc measurements: artifacts associated with high intracellular dye concentration. *Molecular Pharmacology*, 62(3), 618–627.
- Dineley, K. E., Scanlon, J. M., Kress, G. J., Stout, A. K., & Reynolds, I. J. (2000). Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased [Zn(2+)](i). *Neurobiology of Disease*, 7(4), 310–320. doi:10.1006/nbdi.2000.0303

- Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3(1), 79–83.
- Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(5), 543–550.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703–716.
- Dufner-Beattie, J., Langmade, S. J., Wang, F., Eide, D., & Andrews, G. K. (2003). Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50142–50150. doi:10.1074/jbc.M304163200
- Ebadi, M. (1986). Biochemical characterization of a metallothionein-like protein in rat brain. *Biological Trace Element Research*, 11(1), 101–116. doi:10.1007/BF02795528
- Ebadi, M., Elsayed, M. A., & Aly, M. H. (1994). The importance of zinc and metallothionein in brain. *Biological Signals*, 3(3), 123–126.
- Ebadi, M., Iversen, P. L., Hao, R., Cerutis, D. R., Rojas, P., Happe, H. K., et al. (1995). Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochemistry International*, 27(1), 1–22.
- Eckardt, M. J., File, S. E., Gessa, G. L., Grant, K. A., Guerri, C., Hoffman, P. L., et al. (1998). Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22(5), 998–1040.
- Eide, D. J. (2004). The SLC39 family of metal ion transporters. *European Journal of Physiology*, 447(5), 796–800. doi:10.1007/s00424-003-1074-3
- Eide, D. J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763(7), 711–722. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.03.005
- Einfeld, S. L., & Brown, R. (2010). Down syndrome--new prospects for an ancient disorder. *JAMA Internal Medicine*, 303(24), 2525–2526. doi:10.1001/jama.2010.842
- Eissler, R., & Longenecker, L. P. (1962). The common eye findings in mongolism. *American Journal of Ophthalmology*, 54, 398–406.
- Ellis, C. D., Macdiarmid, C. W., & Eide, D. J. (2005). Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(31), 28811–28818. doi:10.1074/jbc.M505500200
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, 25(9-10), 1439–1451.
- Ernhart, C. B., Sokol, R. J., Martier, S., Moron, P., Nadler, D., Ager, J. W., & Wolf, A. (1987). Alcohol teratogenicity in the human: a detailed assessment of specificity, critical period, and threshold. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 156(1), 33–39.
- Eroglu, C., & Barres, B. A. (2010). Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, 468(7321), 223–231. doi:10.1038/nature09612
- Escorihuela, R. M., Fernandez-Teruel, A., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., et al. (1995). A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neuroscience Letters*, 199(2), 143–146.
- Escorihuela, R. M., Vallina, I. F., Martinez-Cue, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobena, A., et al. (1998). Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down

- syndrome. *Neuroscience Letters*, 247(2-3), 171–174.
- Eysseric, H., Gonthier, B., Soubeyran, A., Bessard, G., Saxod, R., & Barret, L. (1997). Characterization of the production of acetaldehyde by astrocytes in culture after ethanol exposure. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 21(6), 1018–1023.
- Fagerlund, A., Heikkinen, S., Autti-Ramo, I., Korkman, M., Timonen, M., Kuusi, T., *et al.* (2006). Brain metabolic alterations in adolescents and young adults with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(12), 2097–2104. doi:10.1111/j.1530-0277.2006.00257.x
- Famy, C., Streissguth, A. P., & Unis, A. S. (1998). Mental illness in adults with fetal alcohol syndrome or fetal alcohol effects. *The American Journal of Psychiatry*, 155(4), 552–554.
- Farkas, L. G., Katic, M. J., & Forrest, C. R. (2002). Surface anatomy of the face in Down's syndrome: age-related changes of anthropometric proportion indices in the craniofacial regions. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 13(3), 368–374.
- Farkas, L. G., Posnick, J. C., & Hreczko, T. (1991). Anthropometry of the head and face in 95 Down syndrome patients. *Progress in Clinical and Biological Research*, 373, 53–97.
- Federici, C., Camoin, L., Creminon, C., Chaverot, N., Strosberg, A. D., & Couraud, P. O. (1995). Cultured astrocytes release a factor that decreases endothelin-1 secretion by brain microvessel endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 64(3), 1008–1015.
- Fellin, T., Pascual, O., & Haydon, P. G. (2006). Astrocytes coordinate synaptic networks: balanced excitation and inhibition. *Physiology*, 21, 208–215. doi:10.1152/physiol.00161.2005
- Fernandes, A., Mourato, A. P., Xavier, M. J., Andrade, D., Fernandes, C., & Palha, M. (2001). Characterisation of the somatic evolution of Portuguese children with Trisomy 21--preliminary results. *Down's Syndrome, Research and Practice*, 6(3), 134–138.
- Ferrario, V. F., Dellavia, C., Colombo, A., & Sforza, C. (2004). Three-dimensional assessment of nose and lip morphology in subjects with down syndrome. *Annals of Plastic Surgery*, 53(6), 577–583.
- Fields, R. D., & Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298(5593), 556–562. doi:10.1126/science.298.5593.556
- Figueroa, J. A. L., Vignesh, K. S., Deepe, G. S. J., & Caruso, J. (2014). Selectivity and specificity of small molecule fluorescent dyes/probes used for the detection of Zn²⁺ and Ca²⁺ in cells. *Metallomics*, 6(2), 301–315. doi:10.1039/c3mt00283g
- Fischer-Brandies, H., Schmid, R. G., & Fischer-Brandies, E. (1986). Craniofacial development in patients with Down's syndrome from birth to 14 years of age. *European Journal of Orthodontics*, 8(1), 35–42.
- Fisher, W. L. J. (1983). Quantitative and qualitative characteristics of the face in Down's syndrome. *The Journal of the Michigan Dental Association*, 65(2), 105–107.
- Fishler, K., Koch, R., & Donnell, G. N. (1976). Comparison of mental development in individuals with mosaic and trisomy 21 Down's syndrome. *Pediatrics*, 58(5), 744–748.
- Fleischhauer, K., & Horstmann, E. (1957). [Intravital dithizone staining of homologous fields of the Ammon's formation in mammals]. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 46(5), 598–609.
- Florianczyk, B. (2000). Zinc level in selected tissues of ethanol and morphine intoxicated mice. *Medical Science Monitor*, 6(4), 680–683.

- Florianczyk, B., & Stryjecka-Zimmer, M. (2001). Induction of metallothioneins by ethanol and morphine. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina*, 56, 183–187.
- Flynn, A., Miller, S. I., Martier, S. S., Golden, N. L., Sokol, R. J., & Del Villano, B. C. (1981). Zinc status of pregnant alcoholic women: a determinant of fetal outcome. *Lancet*, 1(8220 Pt 1), 551–572.
- Folin, M., Baiguera, S., Conconi, M. T., Pati, T., Grandi, C., Parnigotto, P. P., & Nussdorfer, G. G. (2003). The impact of risk factors of Alzheimer's disease in the Down syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, 11(2), 267–270.
- Forbes, J. R., & Gros, P. (2003). Iron, manganese, and cobalt transport by Nramp1 (Slc11a1) and Nramp2 (Slc11a2) expressed at the plasma membrane. *Blood*, 102(5), 1884–92. doi:10.1182/blood-2003-02-0425
- Fraker, P. J., & Telford, W. G. (1997). A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 215(3), 229–236.
- Frederickson, C. J. (1989). Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *International Review of Neurobiology*, 31, 145–238.
- Frederickson, C. J., Cuajungco, M. P., & Frederickson, C. J. (2005). Is zinc the link between compromises of brain perfusion (excitotoxicity) and Alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease*, 8(2), 115–155.
- Frederickson, C. J., & Danscher, G. (1990). Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Progress in Brain Research*, 83, 71–84.
- Frederickson, C. J., Hernandez, M. D., & McGinty, J. F. (1989). Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Research*, 480(1-2), 317–321.
- Frederickson, C. J., Kasarskis, E. J., Ringo, D., & Frederickson, R. E. (1987). A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 20(2), 91–103.
- Freeman, S. B., Allen, E. G., Oxford-Wright, C. L., Tinker, S. W., Druschel, C., Hobbs, C. A., *et al.* (2007). The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Reports*, 122(1), 62–72.
- Friedman, B., & Price, J. L. (1984). Fiber systems in the olfactory bulb and cortex: a study in adult and developing rats, using the timm method with the light and electron microscope. *The Journal of Comparative Neurology*, 223(1), 88–109. doi:10.1002/cne.902230108
- Fryer, S. L., McGee, C. L., Matt, G. E., Riley, E. P., & Mattson, S. N. (2007). Evaluation of psychopathological conditions in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Pediatrics*, 119(3), e733–41. doi:10.1542/peds.2006-1606
- Fuwa, K., Wacker, W. E., Druyan, R., Bartholomay, A. F., & Vallee, B. L. (1960). Nucleic acids and metals, II: transition metals as determinants of the conformation of ribonucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 46(10), 1298–1307.
- Gabryel, B., Chalimoniuk, M., Stolecka, A., & Langfort, J. (2007). Activation of cPLA2 and sPLA2 in astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro. *Cell Biology International*, 31(9), 958–965. doi:10.1016/j.cellbi.2007.03.005

- Gaither, L. A., & Eide, D. J. (2000). Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5560–5564.
- Gaither, L. A., & Eide, D. J. (2001). The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22258–22264. doi:10.1074/jbc.M101772200
- Gardiner, K., & Davisson, M. (2000). The sequence of human chromosome 21 and implications for research into Down syndrome. *Genome Biology*, 1(2), reviews0002. doi:10.1186/gb-2000-1-2-reviews0002
- Gardiner, K., Fortna, A., Bechtel, L., & Davisson, M. T. (2003). Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene*, 318, 137–47.
- Garn, S. M., Stimson, C. W., & Lewis, A. B. (1970). Magnitude of dental delay in trisomy G. *Journal of Dental Research*, 49(3), 640.
- Gazaryan, I. G., Krasinskaya, I. P., Kristal, B. S., & Brown, A. M. (2007). Zinc irreversibly damages major enzymes of energy production and antioxidant defense prior to mitochondrial permeability transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24373–24380. doi:10.1074/jbc.M611376200
- Ge, Y., Belcher, S. M., & Light, K. E. (2004). Alterations of cerebellar mRNA specific for BDNF, p75NTR, and TrkB receptor isoforms occur within hours of ethanol administration to 4-day-old rat pups. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 151(1-2), 99–109. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.04.002
- Gee, K. R., Zhou, Z.-L., Ton-That, D., Sensi, S. L., & Weiss, J. H. (2002). Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium*. doi:10.1016/S0143-4160(02)00053-2
- Glasson, E. J., Sullivan, S. G., Hussain, R., Petterson, B. A., Montgomery, P. D., & Bittles, A. H. (2002). The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clinical Genetics*, 62(5), 390–393.
- Goldman, S. (2003). Glia as neural progenitor cells. *Trends in Neurosciences*, 26(11), 590–596. doi:10.1016/j.tins.2003.09.011
- Goodlett, C. R., & Horn, K. H. (2001). Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research & Health*, 25(3), 175–184.
- Goodlett, C. R., Horn, K. H., & Zhou, F. C. (2005). Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 394–406.
- Goodlett, C. R., & Lundahl, K. R. (1996). Temporal determinants of neonatal alcohol-induced cerebellar damage and motor performance deficits. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 55(4), 531–540.
- Grabrucker, A. M., Rowan, M., & Garner, C. C. (2011). Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review. *Drug Delivery Letters*, 1(1), 13–23.
- Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 89–105. doi:10.1007/s00401-009-0622-0
- Grauert, A., Engel, D., & Ruiz, A. J. (2014). Endogenous zinc depresses GABAergic transmission via T-type Ca(2+) channels and broadens the time window for integration of glutamatergic inputs in dentate granule cells. *The Journal of Physiology*, 592(Pt 1), 67–86.

doi:10.1113/jphysiol.2013.261420

- Gressens, P., Lammens, M., Picard, J. J., & Evrard, P. (1992). Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. *Alcohol and Alcoholism*, 27(3), 219–226.
- Grosche, J., Kettenmann, H., & Reichenbach, A. (2002). Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 68(2), 138–149.
- Grosche, J., Matyash, V., Moller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., & Kettenmann, H. (1999). Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neuroscience*, 2(2), 139–143. doi:10.1038/5692
- Grzybek, H., Sliwa-Tomczok, W., & Tomczok, J. (1990). Application on Timm sulphide silver method for electron microscope localization of lead ions in blood cells. *Folia Haematologica*, 117(2), 277–282.
- Guerinot, M. L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 190–198.
- Guerri, C. (2002). Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotoxicity Research*, 4(4), 327–335. doi:10.1080/1029842021000010884
- Guerri, C., Bazinet, A., & Riley, E. P. (2009). Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol and Alcoholism*, 44(2), 108–114. doi:10.1093/alcalc/agn105
- Guerri, C., Pascual, M., & Renau-Piqueras, J. (2001). Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology*, 22(5), 593–599.
- Guerri, C., & Renau-Piqueras, J. (1997). Alcohol, astroglia, and brain development. *Molecular Neurobiology*, 15(1), 65–81. doi:10.1007/BF02740616
- Guihard-Costa, A.-M., Khung, S., Delbecque, K., Menez, F., & Delezoide, A.-L. (2006). Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21. *Pediatric Research*, 59(1), 33–38. doi:10.1203/01.pdr.0000190580.88391.9a
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., *et al.* (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*, 388(6641), 482–8. doi:10.1038/41343
- Haase, H., & Beyersmann, D. (2002). Intracellular zinc distribution and transport in C6 rat glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(4), 923–928.
- Hagimori, M. (2013). [Development of Zn(2+) selective fluorescent probes for biological applications]. *Yakugaku zasshi*, 133(10), 1087–1092.
- Halassa, M. M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., & Haydon, P. G. (2007). Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of Neuroscience*, 27(24), 6473–6477. doi:10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007
- Halassa, M. M., & Haydon, P. G. (2010). Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annual Review of Physiology*, 72, 335–355. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135843
- Hall, B. (1964). Mongolism in newborns. A clinical and cytogenetic study. *Acta Paediatrica Supplementum*, 154:1–95.

- Han, X., Chen, M., Wang, F., Windrem, M., Wang, S., Shanz, S., *et al.* (2013). Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*, 12(3), 342–353. doi:10.1016/j.stem.2012.12.015
- Hancock, S. M., Finkelstein, D. I., & Adlard, P. A. (2014). Glia and zinc in ageing and Alzheimer's disease: a mechanism for cognitive decline? *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 137. doi:10.3389/fnagi.2014.00137
- Hao, Q., & Maret, W. (2006). Aldehydes release zinc from proteins. A pathway from oxidative stress/lipid peroxidation to cellular functions of zinc. *The FEBS Journal*, 273(18), 4300–4310. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05428.x
- Harrison, N. L., & Gibbons, S. J. (1994). Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 33(8), 935–952.
- Hassold, T., Hunt, P. A., & Sherman, S. (1993). Trisomy in humans: incidence, origin and etiology. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3(3), 398–403.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T. D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H. S., *et al.* (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405(6784), 311–319. doi:10.1038/35012518
- Haug, F. M. (1967). Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie. Histochemistry. Histochimie*, 8(4), 355–368.
- Haug, F. M., & Danscher, G. (1971). Effect of intravital dithizone treatment on the Timm sulfide silver pattern of rat brain. *Histochemistry*, 27(4), 290–299.
- Haug, M. (1973). [The urine of the lactating female contains a pheromone stimulating aggression in small groups of female mice]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences. Serie D: Sciences naturelles*, 277(19), 2053–2056.
- Haugen, O. H., Hovding, G., & Eide, G. E. (2001). Biometric measurements of the eyes in teenagers and young adults with Down syndrome. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 79(6), 616–625.
- Haydon, P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(3), 185–193. doi:10.1038/35058528
- He, J., Nixon, K., Shetty, A. K., & Crews, F. T. (2005). Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *The European Journal of Neuroscience*, 21(10), 2711–2720. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04120.x
- Henderson, G. I., Chen, J. J., & Schenker, S. (1999). Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Frontiers in Bioscience*, 4, D541–50.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., & Robinson, S. R. (1999). Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 57(4), 417–428.
- Hesketh, J. E. (1982). Zinc-stimulated microtubule assembly and evidence for zinc binding to tubulin. *The International Journal of Biochemistry*, 14(11), 983–990.
- Hidalgo, J., Garcia, A., Oliva, A. M., Giralt, M., Gasull, T., Gonzalez, B., *et al.* (1994). Effect of zinc, copper and glucocorticoids on metallothionein levels of cultured neurons and astrocytes from rat brain. *Chemico-Biological Interactions*, 93(3), 197–219.
- Hinkle, P. M., Shanshala, E. D. 2nd, & Nelson, E. J. (1992). Measurement of intracellular cadmium with fluorescent dyes. Further evidence for the role of calcium channels in

- cadmium uptake. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(35), 25553–25559.
- Hof, P. R., Bouras, C., Perl, D. P., Sparks, D. L., Mehta, N., & Morrison, J. H. (1995). Age-related distribution of neuropathologic changes in the cerebral cortex of patients with Down's syndrome. Quantitative regional analysis and comparison with Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*, 52(4), 379–391.
- Holland, A. J., Hon, J., Huppert, F. A., & Stevens, F. (2000). Incidence and course of dementia in people with Down's syndrome: findings from a population-based study. *Journal of Intellectual Disability Research*, 44 (Pt 2), 138–146.
- Holownia, A., Ledig, M., Mapoles, J., & Menez, J. F. (1996). Acetaldehyde-induced growth inhibition in cultured rat astroglial cells. *Alcohol*, 13(1), 93–97.
- Holtzman, D. M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D. J., Daniels, S. E., et al. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13333–13338.
- Horner, P. J., & Palmer, T. D. (2003). New roles for astrocytes: the nightlife of an “astrocyte”. La vida local! *Trends in Neurosciences*, 26(11), 597–603. doi:10.1016/j.tins.2003.09.010
- Howell, G. A., Frederickson, C. J., & Danscher, G. (1989). Evidence from dithizone and selenium zinc histochemistry that perivascular mossy fiber boutons stain preferentially “in vivo”. *Histochemistry*, 92(2), 121–125.
- Howell, G. A., Welch, M. G., & Frederickson, C. J. (1984). Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature*, 308(5961), 736–8.
- Howell, K. K., Lynch, M. E., Platzman, K. A., Smith, G. H., & Coles, C. D. (2006). Prenatal alcohol exposure and ability, academic achievement, and school functioning in adolescence: a longitudinal follow-up. *Journal of Pediatric Psychology*, 31(1), 116–126. doi:10.1093/jpepsy/jsj029
- Huang, L., & Gitschier, J. (1997). A novel gene involved in zinc transport is deficient in the lethal milk mouse. *Nature Genetics*, 17(3), 292–297. doi:10.1038/ng1197-292
- Huang, L., Kirschke, C. P., & Gitschier, J. (2002). Functional characterization of a novel mammalian zinc transporter, ZnT6. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26389–26395. doi:10.1074/jbc.M200462200
- Huang, L., Kirschke, C. P., Zhang, Y., & Yu, Y. Y. (2005). The ZIP7 gene (Slc39a7) encodes a zinc transporter involved in zinc homeostasis of the Golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15456–15463. doi:10.1074/jbc.M412188200
- Huang, L., & Tepasamorndech, S. (2013). The SLC30 family of zinc transporters - a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 548–560. doi:10.1016/j.mam.2012.05.008
- Huether, C. A., Martin, R. L., Stoppelman, S. M., D'Souza, S., Bishop, J. K., Torfs, C. P., et al. (1996). Sex ratios in fetuses and liveborn infants with autosomal aneuploidy. *American Journal of Medical Genetics*, 63(3), 492–500. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960614)63:3<492::AID-AJMG15>3.0.CO;2-H
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1369–1376. doi:10.1038/nn2003
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., Wozniak, D. F., Koch, C., Genz, K., et al. (2000).

- Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287(5455), 1056–1060.
- Inoue, K., Matsuda, K., Itoh, M., Kawaguchi, H., Tomoike, H., Aoyagi, T., *et al.* (2002). Osteopenia and male-specific sudden cardiac death in mice lacking a zinc transporter gene, *Znt5*. *Human Molecular Genetics*, 11(15), 1775–1784.
- Izumi, Y., Auberson, Y. P., & Zorumski, C. F. (2006). Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 26(27), 7181–7188. doi:10.1523/JNEUROSCI.1258-06.2006
- Jaarsma, D., & Korf, J. (1990). A novel non-perfusion Timm method for human brain tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 35(2), 125–131.
- Jacobs, S., Cheng, C., & Doering, L. C. (2012). Probing astrocyte function in fragile X syndrome. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 54, 15–31. doi:10.1007/978-3-642-21649-7_2
- Jacobson, J. L., Jacobson, S. W., & Sokol, R. J. (1994). Effects of prenatal exposure to alcohol, smoking, and illicit drugs on postpartum somatic growth. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 18(2), 317–323.
- Jeong, J., & Eide, D. J. (2013). The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2-3), 612–619. doi:10.1016/j.mam.2012.05.011
- Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Bateur, S., Simon, R. P., & Greenberg, D. A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4710–4715. doi:10.1073/pnas.081011098
- Jindal, R. M., Gray, D. W., McShane, P., & Morris, P. J. (1993). Zinc-specific N-(6-methoxy-8-quinolyl)-para-toluenesulfonamide as a selective nontoxic fluorescence stain for pancreatic islets. *Biotechnic & Histochemistry*, 68(4), 196–205.
- Johnson, V. P., Swayze VW, I. I., Sato, Y., & Andreasen, N. C. (1996). Fetal alcohol syndrome: craniofacial and central nervous system manifestations. *American Journal of Medical Genetics*, 61(4), 329–339. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960202)61:4<329::AID-AJMG6>3.0.CO;2-P
- Jones, K. L., & Smith, D. W. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, 302(7836), 999–1001.
- Kagara, N., Tanaka, N., Noguchi, S., & Hirano, T. (2007). Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Science*, 98(5), 692–697. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00446.x
- Kagi, J. H., & Kojima, Y. (1987). Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Supplementum*, 52, 25–61.
- Kahlem, P., Sultan, M., Herwig, R., Steinfath, M., Balzereit, D., Eppens, B., *et al.* (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome Research*, 14(7), 1258–1267. doi:10.1101/gr.1951304
- Kambe, T., Narita, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Hirose, J., Amano, T., Sugiura, N., *et al.* (2002). Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19049–19055. doi:10.1074/jbc.M200910200

- Karnovsky, M. J. (1967). The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *The Journal of Cell Biology*, 35(1), 213–236.
- Karol, N., Brodski, C., Bibi, Y., Kaisman, T., Forberg, M., Hershfinkel, M., *et al.* (2010). Zinc homeostatic proteins in the CNS are regulated by crosstalk between extracellular and intracellular zinc. *Journal of Cellular Physiology*, 224(3), 567–574. doi:10.1002/jcp.22168
- Kasarskis, E. J., Manton, W. I., Devenport, L. D., Kirkpatrick, J. B., Howell, G. A., Klitenick, M. A., & Frederickson, C. J. (1985). Effects of alcohol ingestion on zinc content of human and rat central nervous systems. *Experimental Neurology*, 90(1), 81–95.
- Kava, M. P., Tullu, M. S., Muranjan, M. N., & Girisha, K. M. (2004). Down syndrome: clinical profile from India. *Archives of Medical Research*, 35(1), 31–35. doi:10.1016/j.arcmed.2003.06.005
- Kim, A. H., Sheline, C. T., Tian, M., Higashi, T., McMahon, R. J., Cousins, R. J., & Choi, D. W. (2000). L-type Ca(2+) channel-mediated Zn(2+) toxicity and modulation by ZnT-1 in PC12 cells. *Brain Research*, 886(1-2), 99–107.
- Kim, J., Kim, T.-Y., Hwang, J. J., Lee, J.-Y., Shin, J.-H., Gwag, B. J., & Koh, J.-Y. (2009). Accumulation of labile zinc in neurons and astrocytes in the spinal cords of G93A SOD-1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 34(2), 221–229. doi:10.1016/j.nbd.2009.01.004
- Kim, Y. H., Kim, E. Y., Gwag, B. J., Sohn, S., & Koh, J. Y. (1999). Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience*, 89(1), 175–182.
- Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry International*, 45(2-3), 191–202. doi:10.1016/j.neuint.2003.08.015
- Kirschke, C. P., & Huang, L. (2003). ZnT7, a novel mammalian zinc transporter, accumulates zinc in the Golgi apparatus. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4096–4102. doi:10.1074/jbc.M207644200
- Klein, S. L., Kriegsfeld, L. J., Hairston, J. E., Rau, V., Nelson, R. J., & Yarowsky, P. J. (1996). Characterization of sensorimotor performance, reproductive and aggressive behaviors in segmental trisomic 16 (Ts65Dn) mice. *Physiology & Behavior*, 60(4), 1159–1164.
- Kleschevnikov, A. M., Belichenko, P. V., Villar, A. J., Epstein, C. J., Malenka, R. C., & Mobley, W. C. (2004). Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *The Journal of Neuroscience*, 24(37), 8153–8160. doi:10.1523/JNEUROSCI.1766-04.2004
- Knopfel, M., Zhao, L., & Garrick, M. D. (2005). Transport of divalent transition-metal ions is lost in small-intestinal tissue of b/b Belgrade rats. *Biochemistry*, 44(9), 3454–3465. doi:10.1021/bi048768+
- Kodituwakku, P. W., Handmaker, N. S., Cutler, S. K., Weathersby, E. K., & Handmaker, S. D. (1995). Specific impairments in self-regulation in children exposed to alcohol prenatally. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 19(6), 1558–1564.
- Kofuji, P., & Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), 1045–1056. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.008
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1994). Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience*, 60(4), 1049–1057.
- Kola, I., & Hertzog, P. J. (1998). Down syndrome and mouse models. *Current Opinion in Genetics*

- & *Development*, 8(3), 316–321.
- Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., *et al.* (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4997–5001.
- Kozma, M., Szerdahelyi, P., & Kasa, P. (1981). Histochemical detection of zinc and copper in various neurons of the central nervous system. *Acta Histochemica*, 69(1), 12–17. doi:10.1016/S0065-1281(81)80003-7
- Krezel, A., & Maret, W. (2007). Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *Journal of the American Chemical Society*, 129(35), 10911–10921. doi:10.1021/ja071979s
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32, 149–184. doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135600
- Kruczek, C., Gorg, B., Keitel, V., Pirev, E., Kroncke, K. D., Schliess, F., & Haussinger, D. (2009). Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*, 57(1), 79–92. doi:10.1002/glia.20737
- Kuppermann, M., Learman, L. A., Gates, E., Gregorich, S. E., Nease, R. F. J., Lewis, J., & Washington, A. E. (2006). Beyond race or ethnicity and socioeconomic status: predictors of prenatal testing for Down syndrome. *Obstetrics and Gynecology*, 107(5), 1087–1097. doi:10.1097/01.AOG.0000214953.90248.db
- Kury, S., Dreno, B., Bezieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R., & Moisan, J.-P. (2002). Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nature Genetics*, 31(3), 239–240. doi:10.1038/ng913
- Lange, S. C., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S., Schousboe, A., & Norenberg, M. D. (2012). Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochemical Research*, 37(11), 2569–2588. doi:10.1007/s11064-012-0868-0
- Larsson, G., Bohlin, A. B., & Tunell, R. (1985). Prospective study of children exposed to variable amounts of alcohol in utero. *Archives of Disease in Childhood*, 60(4), 316–321.
- Lee, J.-G., Yon, J.-M., Lin, C., Jung, A. Y., Jung, K. Y., & Nam, S.-Y. (2012). Combined treatment with capsaicin and resveratrol enhances neuroprotection against glutamate-induced toxicity in mouse cerebral cortical neurons. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 3877–3885. doi:10.1016/j.fct.2012.08.040
- Lee, S.-J., & Koh, J.-Y. (2010). Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Molecular Brain*, 3(1), 30. doi:10.1186/1756-6606-3-30
- Legendre, P., & Westbrook, G. L. (1990). The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *The Journal of Physiology*, 429, 429–449.
- Lejeune, J., Turpin, R., & Gautier, M. (1959). [Chromosomic diagnosis of mongolism]. *Archives francaises de pediatrie*, 16, 962–963.
- Levenson, C. W., & Tassabehji, N. M. (2004). Iron and ageing: an introduction to iron regulatory mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 3(3), 251–263. doi:10.1016/j.arr.2004.03.001
- Levison, S. W., & Goldman, J. E. (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*, 10(2), 201–212.

- Li, Z., Yu, T., Morishima, M., Pao, A., LaDuca, J., Conroy, J., *et al.* (2007). Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Human Molecular Genetics*, *16*(11), 1359–1366. doi:10.1093/hmg/ddm086
- Liang, H. L., Dhar, S. S., & Wong-Riley, M. T. T. (2010). p38 mitogen-activated protein kinase and calcium channels mediate signaling in depolarization-induced activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(3), 640–649. doi:10.1002/jnr.22222
- Liao, S.-L., Ou, Y.-C., Lin, S.-Y., Kao, T.-K., Pan, H.-C., Chang, C.-Y., *et al.* (2011). Signaling cascades mediate astrocyte death induced by zinc. *Toxicology Letters*, *204*(2-3), 108–117. doi:10.1016/j.toxlet.2011.04.018
- Licastro, F., Mocchegiani, E., Masi, M., & Fabris, N. (1993). Modulation of the neuroendocrine system and immune functions by zinc supplementation in children with Down's syndrome. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, *7*(4), 237–239.
- Lichten, L. A., & Cousins, R. J. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual Review of Nutrition*, *29*, 153–176. doi:10.1146/annurev-nutr-033009-083312
- Liddell, J. R., Dringen, R., Crack, P. J., & Robinson, S. R. (2006). Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia*, *54*(8), 873–879. doi:10.1002/glia.20433
- Lima, A. S., Cardoso, B. R., & Cozzolino, S. F. (2010). Nutritional status of zinc in children with Down syndrome. *Biological Trace Element Research*, *133*(1), 20–28. doi:10.1007/s12011-009-8408-8
- Lin, S.-C., & Bergles, D. E. (2004). Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia*, *47*(3), 290–298. doi:10.1002/glia.20060
- Lindah, M., & Tagesson, C. (1996). Zinc (Zn²⁺) binds to and stimulates the activity of group I but not group II phospholipase A2. *Inflammation*, *20*(6), 599–611.
- Lindsley, T. A., Kerlin, A. M., & Rising, L. J. (2003). Time-lapse analysis of ethanol's effects on axon growth in vitro. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *147*(1-2), 191–199.
- Lioumi, M., Ferguson, C. A., Sharpe, P. T., Freeman, T., Marenholz, I., Mischke, D., *et al.* (1999). Isolation and characterization of human and mouse ZIRTL, a member of the IRT1 family of transporters, mapping within the epidermal differentiation complex. *Genomics*, *62*(2), 272–280. doi:10.1006/geno.1999.5993
- Liu, D. P., Schmidt, C., Billings, T., & Davisson, M. T. (2003). Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *BioTechniques*, *35*(6), 1170–4, 1176, 1178.
- Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y.-W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., *et al.* (2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB Journal*, *22*(9), 3224–3233. doi:10.1096/fj.07-104539
- Liuzzi, J. P., Blanchard, R. K., & Cousins, R. J. (2001). Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *The Journal of Nutrition*, *131*(1), 46–52.
- Loney, K. D., Uddin, K. R., & Singh, S. M. (2003). Strain-specific brain metallothionein II (MT-

- II) gene expression, its ethanol responsiveness, and association with ethanol preference in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 27(3), 388–395. doi:10.1097/01.ALC.0000056613.00588.7C
- Lopez-Garcia, C., & Martinez-Guijarro, F. J. (1988). Neurons in the medial cortex give rise to Timm-positive boutons in the cerebral cortex of lizards. *Brain Research*, 463(2), 205–217.
- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Perez-Claussel, J., & Martinez-Guijarro, F. J. (1984). A sulphide-osmium procedure for detection of metal-containing synaptic boutons in the lizard cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, 11(4), 211–220.
- Lopez-Garcia, C., Varea, E., Palop, J. J., Nacher, J., Ramirez, C., Ponsoda, X., & Molowny, A. (2002). Cytochemical techniques for zinc and heavy metals localization in nerve cells. *Microscopy Research and Technique*, 56(5), 318–331. doi:10.1002/jemt.10037
- Lorenzi, H., Duvall, N., Cherry, S. M., Reeves, R. H., & Roper, R. J. (2010, January). PCR prescreen for genotyping the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *BioTechniques*. England.
- Lott, I. T., & Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *The Lancet. Neurology*, 9(6), 623–633. doi:10.1016/S1474-4422(10)70112-5
- Lott, I. T., & Head, E. (2005). Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiology of Aging*, 26(3), 383–389. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.08.005
- Lu, B., Yokoyama, M., Dreyfus, C. F., & Black, I. B. (1991). NGF gene expression in actively growing brain glia. *The Journal of Neuroscience*, 11(2), 318–326.
- Luo, J., & Miller, M. W. (1996). Ethanol inhibits basic fibroblast growth factor-mediated proliferation of C6 astrocytoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1448–1456.
- Lupton, C., Burd, L., & Harwood, R. (2004). Cost of fetal alcohol spectrum disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 127C(1), 42–50. doi:10.1002/ajmg.c.30015
- Luskin, M. B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 11(1), 173–189.
- Luskin, M. B., & McDermott, K. (1994). Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone. *Glia*, 11(3), 211–226. doi:10.1002/glia.440110302
- Lyle, W. M., Woodruff, M. E., & Zuccaro, V. S. (1972). A review of the literature on Down's syndrome and an optometrical survey of 44 patients with the syndrome. *American Journal of Optometry and Archives of American Academy of Optometry*, 49(9), 715–727.
- Mackenzie, G. G., Keen, C. L., & Oteiza, P. I. (2006). Microtubules are required for NF-kappaB nuclear translocation in neuroblastoma IMR-32 cells: modulation by zinc. *Journal of Neurochemistry*, 99(2), 402–415. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04005.x
- Mackenzie, G. G., & Oteiza, P. I. (2007). Zinc and the cytoskeleton in the neuronal modulation of transcription factor NFAT. *Journal of Cellular Physiology*, 210(1), 246–256. doi:10.1002/jcp.20861
- Magistretti, P. J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *The Journal of Experimental Biology*, 209(Pt 12), 2304–2311. doi:10.1242/jeb.02208
- Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (1999). Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose

- Utilization in the Brain. *News in Physiological Sciences*, 14, 177–182.
- Maier, S.E.; Chen, W.; West, J. (1996). The effects of timing and duration of alcohol exposure on development of fetal brain. In *Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention*. Boca ratón, Florida, USA: Ernest L. Abel, CRC Press LLC (pp. 27–50).
- Malaiyandi, L. M., Dineley, K. E., & Reynolds, I. J. (2004). Divergent consequences arise from metallothionein overexpression in astrocytes: zinc buffering and oxidant-induced zinc release. *Glia*, 45(4), 346–353. doi:10.1002/glia.10332
- Malisza, K. L., Allman, A.-A., Shiloff, D., Jakobson, L., Longstaffe, S., & Chudley, A. E. (2005). Evaluation of spatial working memory function in children and adults with fetal alcohol spectrum disorders: a functional magnetic resonance imaging study. *Pediatric Research*, 58(6), 1150–1157. doi:10.1203/01.pdr.0000185479.92484.a1
- Marin, M. P., Tomas, M., Esteban-Pretel, G., Megias, L., Lopez-Iglesias, C., Egea, G., & Renau-Piqueras, J. (2008). Chronic ethanol exposure induces alterations in the nucleocytoplasmic transport in growing astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 106(4), 1914–1928. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05514.x
- Marques, R. C., de Sousa, A. F., do Monte, S. J. H., Oliveira, F. E., do Nascimento Nogueira, N., & Marreiro, D. do N. (2007). Zinc nutritional status in adolescents with Down syndrome. *Biological Trace Element Research*, 120(1-3), 11–18. doi:10.1007/s12011-007-0061-5
- Martin, A. B., Aydemir, T. B., Guthrie, G. J., Samuelson, D. A., Chang, S.-M., & Cousins, R. J. (2013). Gastric and colonic zinc transporter ZIP11 (Slc39a11) in mice responds to dietary zinc and exhibits nuclear localization. *The Journal of Nutrition*, 143(12), 1882–1888. doi:10.3945/jn.113.184457
- Martinez, S. E., & Egea, G. (2007). Novel molecular targets for the prevention of fetal alcohol syndrome. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 2(1), 23–35.
- Martinez-Guijarro, F. J., Molowny, A., & Lopez-Garcia, C. (1987). Timm-staining intensity is correlated with the density of Timm-positive presynaptic structures in the cerebral cortex of lizards. *Histochemistry*, 86(3), 315–319.
- Martinez-Guijarro, F. J., Soriano, E., Del Rio, J. A., & Lopez-Garcia, C. (1991). Zinc-positive boutons in the cerebral cortex of lizards show glutamate immunoreactivity. *Journal of Neurocytology*, 20(10), 834–843.
- Maske, H. (1955). [Relation between insulin and zinc in the islands of Langerhans, with special reference to blood sugar control and insulin secretion]. *Experientia*, 11(3), 122–128.
- Masters, B. A., Quaife, C. J., Erickson, J. C., Kelly, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., *et al.* (1994). Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *The Journal of Neuroscience*, 14(10), 5844–5857.
- Matsuura, W., Yamazaki, T., Yamaguchi-Iwai, Y., Masuda, S., Nagao, M., Andrews, G. K., & Kambe, T. (2009). SLC39A9 (ZIP9) regulates zinc homeostasis in the secretory pathway: characterization of the ZIP subfamily I protein in vertebrate cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(5), 1142–1148. doi:10.1271/bbb.80910
- Mattson, M. P., & Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), 278–294. doi:10.1038/nrn1886
- Mattson, S. N., Goodman, A. M., Caine, C., Delis, D. C., & Riley, E. P. (1999). Executive functioning in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcoholism, Clinical and*

- Experimental Research*, 23(11), 1808–1815.
- Mattson, S. N., & Riley, E. P. (1998). A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22(2), 279–294.
- Mattson, S. N., Riley, E. P., Delis, D. C., Stern, C., & Jones, K. L. (1996). Verbal learning and memory in children with fetal alcohol syndrome. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 20(5), 810–816.
- Mauch, D. H., Nagler, K., Schumacher, S., Goritz, C., Muller, E. C., Otto, A., & Pfrieder, F. W. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*, 294(5545), 1354–1357. doi:10.1126/science.294.5545.1354
- May, P. A., & Gossage, J. P. (2001). Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 25(3), 159–167.
- Mayer, M. L., & Vyklicky, L. J. (1989). The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *The Journal of Physiology*, 415, 351–365.
- Mayer, M. L., & Westbrook, G. L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 28(3), 197–276.
- McCarver, D. G. (2001, April). ADH2 and CYP2E1 genetic polymorphisms: risk factors for alcohol-related birth defects. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. United States.
- Megarbane, A., Ravel, A., Mircher, C., Sturtz, F., Grattau, Y., Rethore, M.-O., et al. (2009). The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genetics in Medicine*, 11(9), 611–616. doi:10.1097/GIM.0b013e3181b2e34c
- Megias, L., Guerri, C., Fornas, E., Azorin, I., Bendala, E., Sancho-Tello, M., et al. (2000). Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. *The International Journal of Developmental Biology*, 44(2), 209–221.
- Mengual, E., Casanovas-Aguilar, C., Perez-Clausell, J., & Gimenez-Amaya, J. M. (1995). Heterogeneous and compartmental distribution of zinc in the striatum and globus pallidus of the rat. *Neuroscience*, 66(3), 523–537.
- Mengual, E., Casanovas-Aguilar, C., Perez-Clausell, J., & Gimenez-Amaya, J. M. (2001). Thalamic distribution of zinc-rich terminal fields and neurons of origin in the rat. *Neuroscience*, 102(4), 863–884.
- Mennella, J. (2001). Alcohol's effect on lactation. *Alcohol Research & Health*, 25(3), 230–234.
- Miller, M. W. (1992). Circadian rhythm of cell proliferation in the telencephalic ventricular zone: effect of in utero exposure to ethanol. *Brain Research*, 595(1), 17–24.
- Miller, M. W. (1995). Effect of pre- or postnatal exposure to ethanol on the total number of neurons in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: cell proliferation and neuronal death. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 19(5), 1359–1363.
- Miller, M. W., & Dow-Edwards, D. L. (1988). Structural and metabolic alterations in rat cerebral cortex induced by prenatal exposure to ethanol. *Brain Research*, 474(2), 316–326.
- Miller, M. W., & Robertson, S. (1993). Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal

- development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 337(2), 253–266. doi:10.1002/cne.903370206
- Mills, J. L., Graubard, B. I., Harley, E. E., Rhoads, G. G., & Berendes, H. W. (1984). Maternal alcohol consumption and birth weight. How much drinking during pregnancy is safe? *JAMA Internal Medicine*, 252(14), 1875–1879.
- Milner, R. (2012). *Astrocytes* (1st ed.). Hertfordshire: Springer. doi:10.1007/978-1-61779-452-0
- Milosevic, A., & Goldman, J. E. (2002). Progenitors in the postnatal cerebellar white matter are antigenically heterogeneous. *The Journal of Comparative Neurology*, 452(2), 192–203. doi:10.1002/cne.10384
- Mirsky, R., & Jessen, K. R. (1996). Schwann cell development, differentiation and myelination. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(1), 89–96.
- Mizukawa, K., Tseng, I. M., & Otsuka, N. (1989). Quantitative electron microscopic analysis of postnatal development of zinc-positive nerve endings in the rat amygdala using Timm's sulphide silver technique. *Brain Research*, 50(2), 197–203.
- Molina, F., Persico, N., Borenstein, M., Sonek, J., & Nicolaides, K. H. (2008). Frontomaxillary facial angle in trisomy 21 fetuses at 16-24 weeks of gestation. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 31(4), 384–387. doi:10.1002/uog.5288
- Molnar, P., & Nadler, J. V. (2001). Synaptically-released zinc inhibits N-methyl-D-aspartate receptor activation at recurrent mossy fiber synapses. *Brain Research*, 910(1-2), 205–207.
- Moore, C. S., Hawkins, C., Franca, A., Lawler, A., Devenney, B., Das, I., & Reeves, R. H. (2010). Increased male reproductive success in Ts65Dn “Down syndrome” mice. *Mammalian Genome*, 21(11-12), 543–549. doi:10.1007/s00335-010-9300-8
- Mori, T., Buffo, A., & Gotz, M. (2005). The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Current Topics in Developmental Biology*, 69, 67–99. doi:10.1016/S0070-2153(05)69004-7
- Morris, D. R., & Levenson, C. W. (2012). Ion channels and zinc: mechanisms of neurotoxicity and neurodegeneration. *Journal of Toxicology*, 2012, 785647. doi:10.1155/2012/785647
- Morris, M. I., Soglio, D. B.-D., Ouimet, A., Aspirot, A., & Patey, N. (2013). A study of calretinin in Hirschsprung pathology, particularly in total colonic aganglionosis. *Journal of Pediatric Surgery*, 48(5), 1037–1043. doi:10.1016/j.jpedsurg.2013.02.026
- Mukherjee, R. A. S., Hollins, S., & Turk, J. (2006). Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 99(6), 298–302. doi:10.1258/jrsm.99.6.298
- Murgia, C., Vespignani, I., Cerase, J., Nobili, F., & Perozzi, G. (1999). Cloning, expression, and vesicular localization of zinc transporter Dri 27/ZnT4 in intestinal tissue and cells. *The American Journal of Physiology*, 277(6 Pt 1), G1231–9.
- Nadel, L. (2003). Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes, Brain, and Behavior*, 2(3), 156–166.
- Nolte, C., Gore, A., Sekler, I., Kresse, W., Hershfinkel, M., Hoffmann, A., et al. (2004). ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc. *Glia*, 48(2), 145–155. doi:10.1002/glia.20065
- Novick, P., & Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(4), 496–504.

- O'Hare, E. D., Kan, E., Yoshii, J., Mattson, S. N., Riley, E. P., Thompson, P. M., *et al.* (2005). Mapping cerebellar vermal morphology and cognitive correlates in prenatal alcohol exposure. *Neuroreport*, *16*(12), 1285–1290.
- O'Kane, R. L., Martinez-Lopez, I., DeJoseph, M. R., Vina, J. R., & Hawkins, R. A. (1999). Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(45), 31891–31895.
- O'Riordan, M. W., & Walker, G. F. (1978). Dimensional and proportional characteristics of the face in Down's syndrome. *Journal of Dentistry for the Handicapped*, *4*(1), 6–9.
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in Neurosciences*, *29*(10), 547–553. doi:10.1016/j.tins.2006.08.004
- Ohana, E., Segal, D., Palty, R., Ton-That, D., Moran, A., Sensi, S. L., *et al.* (2004). A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(6), 4278–4284. doi:10.1074/jbc.M309229200
- Oliver, C. A. (1891). A Clinical Study of the Ocular Symptoms found in the so-called Mongolian Type of Idiocy. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, *6*, 140–148.
- Olney, J. W. (2004). Fetal alcohol syndrome at the cellular level. *Addiction Biology*, *9*(2), 137–49; discussion 151. doi:10.1080/13556210410001717006
- Olson, L. E., Roper, R. J., Baxter, L. L., Carlson, E. J., Epstein, C. J., & Reeves, R. H. (2004). Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Developmental Dynamics*, *230*(3), 581–589. doi:10.1002/dvdy.20079
- Paladini, D., Sglavo, G., Penner, I., Pastore, G., & Nappi, C. (2007). Fetuses with Down syndrome have an enlarged anterior fontanelle in the second trimester of pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *30*(6), 824–829. doi:10.1002/uog.5129
- Palmiter, R. D., Cole, T. B., Quaipe, C. J., & Findley, S. D. (1996). ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(25), 14934–14939.
- Palmiter, R. D., & Findley, S. D. (1995). Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *The EMBO Journal*, *14*(4), 639–649.
- Palmiter, R. D., Findley, S. D., Whitmore, T. E., & Durnam, D. M. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(14), 6333–6337.
- Panayi, A. E., Spyrou, N. M., Iversen, B. S., White, M. A., & Part, P. (2002). Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of the Neurological Sciences*, *195*(1), 1–10.
- Pantazis, N. J., Dohrman, D. P., Goodlett, C. R., Cook, R. T., & West, J. R. (1993). Vulnerability of cerebellar granule cells to alcohol-induced cell death diminishes with time in culture. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *17*(5), 1014–1021.
- Pantazis, N. J., West, J. R., & Dai, D. (1998). The nitric oxide-cyclic GMP pathway plays an essential role in both promoting cell survival of cerebellar granule cells in culture and protecting the cells against ethanol neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, *70*(5), 1826–

1838.

- Paoletti, P., Vergnano, A. M., Barbour, B., & Casado, M. (2009). Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, *158*(1), 126–136. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.061
- Papavassiliou, P., York, T. P., Gursoy, N., Hill, G., Nicely, L. V., Sundaram, U., *et al.* (2009). The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *149A*(4), 573–583. doi:10.1002/ajmg.a.32729
- Parisi, A. F., & Vallee, B. L. (1969). Zinc metalloenzymes: characteristics and significance in biology and medicine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *22*(9), 1222–1239.
- Pascual, M., Climent, E., & Guerri, C. (2001). BDNF induces glutamate release in cerebrocortical nerve terminals and in cortical astrocytes. *Neuroreport*, *12*(12), 2673–2677.
- Pascual, M., & Guerri, C. (2007). The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal-regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *Journal of Neurochemistry*, *103*(2), 557–568. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04761.x
- Pascual, M., Valles, S. L., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (2003). Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *87*(6), 1535–1545.
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., *et al.* (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, *310*(5745), 113–116. doi:10.1126/science.1116916
- Paski, S. C., Covery, L., Kummer, A., & Xu, Z. (2003). Role of metallothionein in regulating the abundance of histochemically reactive zinc in rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *81*(8), 815–824. doi:10.1139/y03-076
- Paski, S. C., & Xu, Z. (2001). Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *12*(11), 655–661.
- Pasti, L., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (1995). Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes. A new form of glutamate-mediated plasticity. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(25), 15203–15210.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, *55*(12), 1251–1262. doi:10.1002/glia.20528
- Peng, Y., Yang, P.-H., Ng, S. S. M., Wong, O. G., Liu, J., He, M.-L., *et al.* (2004). A critical role of Pax6 in alcohol-induced fetal microcephaly. *Neurobiology of Disease*, *16*(2), 370–376. doi:10.1016/j.nbd.2004.03.004
- Penrose, L. S. (1951). Heredity and environment in the causation of foetal malformation. *The Practitioner*, *166*(995), 429–435.
- Perez-Clausell, J. (1996). Distribution of terminal fields stained for zinc in the neocortex of the rat. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, *11*(2), 99–111.
- Perez-Clausell, J., & Danscher, G. (1985). Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Research*, *337*(1), 91–98.
- Peters, S., Koh, J., & Choi, D. W. (1987). Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, *236*(4801), 589–593.

- Petersen, M. B., Antonarakis, S. E., Hassold, T. J., Freeman, S. B., Sherman, S. L., Avramopoulos, D., & Mikkelsen, M. (1993). Paternal nondisjunction in trisomy 21: excess of male patients. *Human Molecular Genetics*, 2(10), 1691–1695.
- Petersen, M. B., & Mikkelsen, M. (2000). Nondisjunction in trisomy 21: origin and mechanisms. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 91(1-4), 199–203. doi:56844
- Phillips, D. E. (1989). Effects of limited postnatal ethanol exposure on the development of myelin and nerve fibers in rat optic nerve. *Experimental Neurology*, 103(1), 90–100.
- Plan de acción para las personas con síndrome de Down en España (2002). Federación Española del Síndrome de Down.
- Polifka, J. E., & Friedman, J. M. (2002). Medical genetics: 1. Clinical teratology in the age of genomics. *Canadian Medical Association Journal*, 167(3), 265–273.
- Popovic, M., Caballero-Bleda, M., & Guerri, C. (2006). Adult rat's offspring of alcoholic mothers are impaired on spatial learning and object recognition in the Can test. *Behavioural Brain Research*, 174(1), 101–111. doi:10.1016/j.bbr.2006.07.012
- Prandini, P., Deutsch, S., Lyle, R., Gagnebin, M., Delucinge Vivier, C., Delorenzi, M., et al. (2007). Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *American Journal of Human Genetics*, 81(2), 252–263. doi:10.1086/519248
- Prasad, A. S. (1991). Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(2), 403–412.
- Prat, M. D., Guiteras, J., Compano, R., & Beltran, J. L. (1991). Spectrofluorimetric method for the simultaneous determination of zinc and cadmium. *Journal of Fluorescence*, 1(4), 267–272. doi:10.1007/BF00865250
- Pringle, N. P., Yu, W.-P., Howell, M., Colvin, J. S., Ornitz, D. M., & Richardson, W. D. (2003). Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development*, 130(1), 93–102.
- Pueschel, S. M. (1998). Towards optimal mental health of persons with Down syndrome. *Down's Syndrome, Research and Practice*, 5(1), 43–46.
- Qian, W. J., Aspinwall, C. A., Battiste, M. A., & Kennedy, R. T. (2000). Detection of secretion from single pancreatic beta-cells using extracellular fluorogenic reactions and confocal fluorescence microscopy. *Analytical Chemistry*, 72(4), 711–717.
- Quintanilla, J. S., Biedma, B. M., Rodriguez, M. Q., Mora, M. T. J., Cunqueiro, M. M. S., & Pazos, M. A. (2002). Cephalometrics in children with Down's syndrome. *Pediatric Radiology*, 32(9), 635–643. doi:10.1007/s00247-002-0703-x
- Radtke, F., Heuchel, R., Georgiev, O., Hergersberg, M., Gariglio, M., Dembic, Z., & Schaffner, W. (1993). Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *The EMBO Journal*, 12(4), 1355–1362.
- Raff, M. C., Miller, R. H., & Noble, M. (1983). A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, 303(5916), 390–396.
- Ralph, D. M., Robinson, S. R., Campbell, M. S., & Bishop, G. M. (2010). Histidine, cystine, glutamine, and threonine collectively protect astrocytes from the toxicity of zinc. *Free*

- Radical Biology & Medicine*, 49(4), 649–657. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.023
- Ramanathan, R., Wilkemeyer, M. F., Mittal, B., Perides, G., & Charness, M. E. (1996). Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *The Journal of Cell Biology*, 133(2), 381–390.
- Randall, C. L., & Saulnier, J. L. (1995). Effect of ethanol on prostacyclin, thromboxane, and prostaglandin E production in human umbilical veins. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 19(3), 741–746.
- Rarick, G. L., Wainer, H., Thissen, D., & Seefeldt, V. (1975). A double logistic comparison of growth patterns of normal children and children with Down's syndrome. *Annals of Human Biology*, 2(4), 339–346.
- Rasmussen, S. A., Wong, L.-Y., Correa, A., Gambrell, D., & Friedman, J. M. (2006). Survival in infants with Down syndrome, Metropolitan Atlanta, 1979-1998. *The Journal of Pediatrics*, 148(6), 806–812. doi:10.1016/j.jpeds.2006.01.010
- Record, I. R., Dreosti, I. E., Tulsi, R. S., & Manuel, S. J. (1986). Maternal metabolism and teratogenesis in zinc-deficient rats. *Teratology*, 33(3), 311–317. doi:10.1002/tera.1420330309
- Reeves, R. H. (2006). Down syndrome mouse models are looking up. *Trends in Molecular Medicine*, 12(6), 237–240. doi:10.1016/j.molmed.2006.04.005
- Reeves, R. H., Baxter, L. L., & Richtsmeier, J. T. (2001). Too much of a good thing: mechanisms of gene action in Down syndrome. *Trends in Genetics: TIG*, 17(2), 83–88.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., *et al.* (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nature Genetics*, 11(2), 177–84. doi:10.1038/ng1095-177
- Reichenbach, A., Siegel, A., Rickmann, M., Wolff, J. R., Noone, D., & Robinson, S. R. (1995). Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *Journal Fur Hirnforschung*, 36(4), 509–517.
- Reinholdt, L. G., Ding, Y., Gilbert, G. J., Czechanski, A., Solzak, J. P., Roper, R. J., *et al.* (2011). Molecular characterization of the translocation breakpoints in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Mammalian Genome*, 22(11-12), 685–691. doi:10.1007/s00335-011-9357-z
- Reis, K. P., Heimfarth, L., Pierozan, P., Ferreira, F., Loureiro, S. O., Fernandes, C. G., *et al.* (2015). High postnatal susceptibility of hippocampal cytoskeleton in response to ethanol exposure during pregnancy and lactation. *Alcohol*. doi:10.1016/j.alcohol.2015.06.005
- Religa, D., Strozyk, D., Cherny, R. A., Volitakis, I., Haroutunian, V., Winblad, B., *et al.* (2006). Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. *Neurology*, 67(1), 69–75. doi:10.1212/01.wnl.0000223644.08653.b5
- Renau-Piqueras, J., Guerri, C., Burgal, M., De Paz, P., Saez, R., & Mayordomo, F. (1992). Prenatal exposure to ethanol alters plasma membrane glycoproteins of astrocytes during development in primary culture as revealed by concanavalin A binding and 5'-nucleotidase activity. *Glia*, 5(1), 65–74. doi:10.1002/glia.440050110
- Renau-Piqueras, J., Zaragoza, R., De Paz, P., Baguena-Cervellera, R., Megias, L., & Guerri, C. (1989). Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative

- immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 37(2), 229–240.
- Reyes, J. G., Santander, M., Martinez, P. L., Arce, R., & Benos, D. J. (1994). A fluorescence method to determine picomole amounts of Zn(II) in biological systems. *Biological Research*, 27(1), 49–56.
- Richtsmeier, J. T., Baxter, L. L., & Reeves, R. H. (2000). Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Developmental Dynamics*, 217(2), 137–145. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(200002)217:2<137:AID-DVDY1>3.0.CO;2-N
- Richtsmeier, J. T., Zumwalt, A., Carlson, E. J., Epstein, C. J., & Reeves, R. H. (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 107(4), 317–324.
- Riikonen, R. S., Nokelainen, P., Valkonen, K., Kolehmainen, A. I., Kumpulainen, K. I., Kononen, M., *et al.* (2005). Deep serotonergic and dopaminergic structures in fetal alcoholic syndrome: a study with nor-beta-CIT-single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging volumetry. *Biological Psychiatry*, 57(12), 1565–1572. doi:10.1016/j.biopsych.2005.01.029
- Riikonen, R., Salonen, I., Partanen, K., & Verho, S. (1999). Brain perfusion SPECT and MRI in foetal alcohol syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 41(10), 652–659.
- Roberts, B. R., Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Malencik, D. A., Anderson, S. R., Bomben, V. C., *et al.* (2007). Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *Journal of Molecular Biology*, 373(4), 877–890. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.043
- Roche, A. F., Seward, F. S., & Sunderland, S. (1961). Nonmetrical observations on cranial roentgenograms in mongolism. *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine*, 85, 659–662.
- Roebuck, T. M., Simmons, R. W., Mattson, S. N., & Riley, E. P. (1998). Prenatal exposure to alcohol affects the ability to maintain postural balance. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 22(1), 252–258.
- Roizen, N. J., & Patterson, D. (2003). Down's syndrome. *Lancet*, 361(9365), 1281–1289. doi:10.1016/S0140-6736(03)12987-X
- Roizen, R. (1996). Women alcoholics at Bellevue, 1918-1919. *Science*, 274, 1450-1451.
- Romero, A. M., Esteban-Pretel, G., Marin, M. P., Ponsoda, X., Ballestin, R., Canales, J. J., & Renau-Piqueras, J. (2010). Chronic ethanol exposure alters the levels, assembly, and cellular organization of the actin cytoskeleton and microtubules in hippocampal neurons in primary culture. *Toxicological Sciences*, 118(2), 602–612. doi:10.1093/toxsci/kfq260
- Room, R. (2005). Commentary: Pattern of drinking and the Russian heart. *International Journal of Epidemiology*, 34(4), 788–790. doi:10.1093/ije/dyi117
- Roper, R. J., & Reeves, R. H. (2006). Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genetics*, 2(3), e50. doi:10.1371/journal.pgen.0020050
- Rosso, L., & Mienville, J.-M. (2009). Pituicyte modulation of neurohormone output. *Glia*, 57(3), 235–243. doi:10.1002/glia.20760
- Rubert, G., Minana, R., Pascual, M., & Guerri, C. (2006). Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and

- astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, 84(3), 483–496. doi:10.1002/jnr.20963
- Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 11–28. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.11
- Ryu, R., Shin, Y., Choi, J.-W., Min, W., Ryu, H., Choi, C.-R., & Ko, H. (2002). Depletion of intracellular glutathione mediates zinc-induced cell death in rat primary astrocytes. *Experimental Brain Research*, 143(2), 257–263. doi:10.1007/s00221-001-0991-7
- Sampson, P. D., Streissguth, A. P., Bookstein, F. L., Little, R. E., Clarren, S. K., Dehaene, P., *et al.* (1997). Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology*, 56(5), 317–326. doi:10.1002/(SICI)1096-9926(199711)56:5<317:AID-TERA5>3.0.CO;2-U
- Samson, H. H., & Diaz, J. (1981). Altered development of brain by neonatal ethanol exposure: zinc levels during and after exposure. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 5(4), 563–569.
- Sanai, N., Tramontin, A. D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., *et al.* (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427(6976), 740–744. doi:10.1038/nature02301
- Sanchez-Andres, J. V., Palop, J. J., Ramirez, C., Nacher, J., Molowny, A., & Lopez-Gracia, C. (1997). Zinc-positive presynaptic boutons of the rabbit hippocampus during early postnatal development. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 103(2), 171–183.
- Sandstead, H. H., Frederickson, C. J., & Penland, J. G. (2000). History of zinc as related to brain function. *The Journal of Nutrition*, 130, 496S–502S.
- Savage, D. D., Montano, C. Y., & Kasarskis, E. J. (1989). Quantitative histofluorescence of hippocampal mossy fiber zinc. *Brain Research*, 496(1-2), 257–267.
- Savage, D. D., Montano, C. Y., Paxton, L. L., & Kasarskis, E. J. (1989). Prenatal ethanol exposure decreases hippocampal mossy fiber zinc in 45-day-old rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 13(4), 588–593.
- Schikorski, T. (2010). Monitoring rapid endocytosis in the electron microscope via photoconversion of vesicles fluorescently labeled with FM1-43. *Methods in Molecular Biology*, 657, 329–346. doi:10.1007/978-1-60761-783-9_26
- Schwartz, J. P. (1992). Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *International Review of Neurobiology*, 34, 1–23.
- Searle, P. F., Davison, B. L., Stuart, G. W., Wilkie, T. M., Norstedt, G., & Palmiter, R. D. (1984). Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Molecular and Cellular Biology*, 4(7), 1221–1230.
- Segawa, S., Nishiura, T., Furuta, T., Ohsato, Y., Tani, M., Nishida, K., & Nagasawa, K. (2014). Zinc is released by cultured astrocytes as a gliotransmitter under hypoosmotic stress-loaded conditions and regulates microglial activity. *Life Sciences*, 94(2), 137–144. doi:10.1016/j.lfs.2013.11.007
- Seitz, H. K., Pelucchi, C., Bagnardi, V., & La Vecchia, C. (2012). Epidemiology and pathophysiology of alcohol and breast cancer: Update 2012. *Alcohol and Alcoholism*, 47(3), 204–212. doi:10.1093/alcalc/ags011
- Sekler, I., Sensi, S. L., Hershfinkel, M., & Silverman, W. F. (2007). Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Molecular Medicine*, 13(7-8), 337–343. doi:10.2119/2007-

00037.Sekler

- Sensi, S. L., Ton-That, D., Weiss, J. H., Rothe, A., & Gee, K. R. (2003). A new mitochondrial fluorescent zinc sensor. *Cell Calcium*, *34*(3), 281–284.
- Sensi, S. L., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (1999). Glutamate triggers preferential Zn²⁺ flux through Ca²⁺ permeable AMPA channels and consequent ROS production. *Neuroreport*, *10*(8), 1723–1727.
- Sensi, S. L., Yin, H. Z., & Weiss, J. H. (2000). AMPA/kainate receptor-triggered Zn²⁺ entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn²⁺ uptake and persistent mitochondrial dysfunction. *The European Journal of Neuroscience*, *12*(10), 3813–3818.
- Seward, F. S., Roche, A. F., & Sunderland, S. (1961). The lateral cranial silhouette in mongolism. *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine*, *85*, 653–658.
- Sforza, C., Dellavia, C., Dolci, C., Donetti, E., & Ferrario, V. F. (2005). A quantitative three-dimensional assessment of abnormal variations in the facial soft tissues of individuals with Down syndrome. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*, *42*(4), 410–416. doi:10.1597/04-005.1
- Sforza, C., Elamin, F., Rosati, R., Lucchini, M. A., De Menezes, M., & Ferrario, V. F. (2011). Morphometry of the ear in north Sudanese subjects with Down syndrome: a three-dimensional computerized assessment. *The Journal of Craniofacial Surgery*, *22*(1), 297–301. doi:10.1097/SCS.0b013e3181f7dd8c
- Sforza, C., Elamin, F., Rosati, R., Lucchini, M. A., Tommasi, D. G., & Ferrario, V. F. (2011). Three-dimensional assessment of nose and lip morphology in North Sudanese subjects with Down syndrome. *The Angle Orthodontist*, *81*(1), 107–114. doi:10.2319/042510-222.1
- Shah, D., & Sachdev, H. P. S. (2006). Zinc deficiency in pregnancy and fetal outcome. *Nutrition Reviews*, *64*(1), 15–30.
- Shapiro, B. L. (2001). Developmental instability of the cerebellum and its relevance to Down syndrome. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, (61), 11–34.
- Sheline, C. T., Takata, T., Ying, H., Canzoniero, L. M. T., Yang, A., Yu, S. P., & Choi, D. W. (2004). Potassium attenuates zinc-induced death of cultured cortical astrocytes. *Glia*, *46*(1), 18–27. doi:10.1002/glia.10313
- Sheline, C. T., Ying, H. S., Ling, C. S., Canzoniero, L. M. T., & Choi, D. W. (2002). Depolarization-induced zinc influx into cultured cortical neurons. *Neurobiology of Disease*, *10*(1), 41–53.
- Shibley, I. A. J., & Pennington, S. N. (1997). Metabolic and mitotic changes associated with the fetal alcohol syndrome. *Alcohol and Alcoholism*, *32*(4), 423–434.
- Shin, M., Siffel, C., & Correa, A. (2010). Survival of children with mosaic Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *152A*(3), 800–801. doi:10.1002/ajmg.a.33295
- Shu, T., & Richards, L. J. (2001). Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *The Journal of Neuroscience*, *21*(8), 2749–2758.
- Shuttleworth, C. W. (2010). Use of NAD(P)H and flavoprotein autofluorescence transients to probe neuron and astrocyte responses to synaptic activation. *Neurochemistry International*, *56*(3), 379–386. doi:10.1016/j.neuint.2009.12.015

- Shuttleworth, G. E. (1886). Clinical Lecture on Idiocy and Imbecility. *British Medical Journal*, *1*(1309), 183–186.
- Siewert, E., Dietrich, C. G., Lammert, F., Heinrich, P. C., Matern, S., Gartung, C., & Geier, A. (2004). Interleukin-6 regulates hepatic transporters during acute-phase response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *322*(1), 232–238. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.102
- Sim, D. L., & Chow, V. T. (1999). The novel human HUEL (C4orf1) gene maps to chromosome 4p12-p13 and encodes a nuclear protein containing the nuclear receptor interaction motif. *Genomics*, *59*(2), 224–233. doi:10.1006/geno.1999.5856
- Simard, M., & Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, *129*(4), 877–896. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.053
- Simons, T. J. (1993). Measurement of free Zn²⁺ ion concentration with the fluorescent probe mag-fura-2 (fura-2). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *27*(1), 25–37.
- Sindreu, C., & Storm, D. R. (2011). Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *5*, 68. doi:10.3389/fnbeh.2011.00068
- Sirrieh, R. E., MacLean, D. M., & Jayaraman, V. (2013). Amino-terminal domain tetramer organization and structural effects of zinc binding in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(31), 22555–22564. doi:10.1074/jbc.M113.482356
- Skoff, R. P., & Knapp, P. E. (1991). Division of astroblasts and oligodendroblasts in postnatal rodent brain: evidence for separate astrocyte and oligodendrocyte lineages. *Glia*, *4*(2), 165–174. doi:10.1002/glia.440040208
- Slomianka, L. (1992). Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat. *Neuroscience*, *48*(2), 325–352.
- Small, D. H., & Cappai, R. (2006). Alois Alzheimer and Alzheimer's disease: a centennial perspective. *Journal of Neurochemistry*, *99*(3), 708–710. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04212.x
- Smart, T. G. (1992). A novel modulatory binding site for zinc on the GABAA receptor complex in cultured rat neurones. *The Journal of Physiology*, *447*, 587–625.
- Smart, T. G., Hosie, A. M., & Miller, P. S. (2004). Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *The Neuroscientist*, *10*(5), 432–442. doi:10.1177/1073858404263463
- Smart, T. G., Moss, S. J., Xie, X., & Haganir, R. L. (1991). GABAA receptors are differentially sensitive to zinc: dependence on subunit composition. *British Journal of Pharmacology*, *103*(4), 1837–1839.
- Smith, S. L., Jennett, R. B., Sorrell, M. F., & Tuma, D. J. (1992). Substoichiometric inhibition of microtubule formation by acetaldehyde-tubulin adducts. *Biochemical Pharmacology*, *44*(1), 65–72.
- Snitsarev, V., Budde, T., Stricker, T. P., Cox, J. M., Krupa, D. J., Geng, L., & Kay, A. R. (2001). Fluorescent detection of Zn(2+)-rich vesicles with Zinquin: mechanism of action in lipid environments. *Biophysical Journal*, *80*(3), 1538–1546. doi:10.1016/S0006-3495(01)76126-7

- Snyder, A. K., Jiang, F., & Singh, S. P. (1992). Effects of ethanol on glucose utilization by cultured mammalian embryos. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 16(3), 466–470.
- Solioz, M., Odermatt, A., & Krapf, R. (1994). Copper pumping ATPases: common concepts in bacteria and man. *FEBS Letters*, 346(1), 44–47.
- Soto-Quintana, M., Alvarez-Nava, F., Rojas-Atencio, A., Granadillo, V., Fernandez, D., Ocando, A., *et al.* (2003). Diminished zinc plasma concentrations and alterations in the number of lymphocyte subpopulations in Down's syndrome patients. *Investigacion clinica*, 44(1), 51–60.
- Sowell, E. R., Jernigan, T. L., Mattson, S. N., Riley, E. P., Sobel, D. F., & Jones, K. L. (1996). Abnormal development of the cerebellar vermis in children prenatally exposed to alcohol: size reduction in lobules I-V. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 20(1), 31–34.
- Sowell, E. R., Mattson, S. N., Thompson, P. M., Jernigan, T. L., Riley, E. P., & Toga, A. W. (2001). Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology*, 57(2), 235–244.
- Sowell, E. R., Thompson, P. M., Mattson, S. N., Tessner, K. D., Jernigan, T. L., Riley, E. P., & Toga, A. W. (2002). Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. *Cerebral Cortex*, 12(8), 856–865.
- Spoehr, H.-L., Willms, J., & Steinhausen, H.-C. (2007). Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *The Journal of Pediatrics*, 150(2), 175–9, 179.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2006.11.044
- Staddon, J. M., & Rubin, L. L. (1996). Cell adhesion, cell junctions and the blood-brain barrier. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(5), 622–627.
- Stoeckli, E. T. (1997). Molecular mechanisms of growth cone guidance: stop and go? *Cell and Tissue Research*, 290(2), 441–449.
- Stoltenberg, M., & Danscher, G. (2000). Histochemical differentiation of autometallographically traceable metals (Au, Ag, Hg, Bi, Zn): protocols for chemical removal of separate autometallographic metal clusters in Epon sections. *The Histochemical Journal*, 32(11), 645–652.
- Stork, C. J., & Li, Y. V. (2009). Rising zinc: a significant cause of ischemic neuronal death in the CA1 region of rat hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(8), 1399–1408. doi:10.1038/jcbfm.2009.64
- Stratford, B., & Ching, E. Y. (1989). Responses to music and movement in the development of children with Down's syndrome. *Journal of Mental Deficiency Research*, 33 (Pt 1), 13–24.
- Streissguth, A. P. (1993). Fetal alcohol syndrome in older patients. *Alcohol and Alcoholism. Supplement*, 2, 209–212.
- Streissguth, A. P., Aase, J. M., Clarren, S. K., Randels, S. P., LaDue, R. A., & Smith, D. F. (1991). Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *JAMA Internal Medicine*, 265(15), 1961–1967.
- Streissguth, A. P., Barr, H. M., Olson, H. C., Sampson, P. D., Bookstein, F. L., & Burgess, D. M. (1994). Drinking during pregnancy decreases word attack and arithmetic scores on

- standardized tests: adolescent data from a population-based prospective study. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 18(2), 248–254.
- Streissguth, A. P., Barr, H. M., & Sampson, P. D. (1990). Moderate prenatal alcohol exposure: effects on child IQ and learning problems at age 7 1/2 years. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 14(5), 662–669.
- Streissguth, A. P., Herman, C. S., & Smith, D. W. (1978). Intelligence, behavior, and dysmorphogenesis in the fetal alcohol syndrome: a report on 20 patients. *The Journal of Pediatrics*, 92(3), 363–367.
- Streissguth, A. P., & O'Malley, K. (2000). Neuropsychiatric implications and long-term consequences of fetal alcohol spectrum disorders. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*, 5(3), 177–190.
- Streissguth, A. P., Sampson, P. D., Olson, H. C., Bookstein, F. L., Barr, H. M., Scott, M., et al. (1994). Maternal drinking during pregnancy: attention and short-term memory in 14-year-old offspring--a longitudinal prospective study. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 18(1), 202–218.
- Suh, S. W., Jensen, K. B., Jensen, M. S., Silva, D. S., Kesslak, P. J., Danscher, G., & Frederickson, C. J. (2000). Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Research*, 852(2), 274–278.
- Sulik, K. K. (2005). Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 366–375.
- Sultan, M., Piccini, I., Balzereit, D., Herwig, R., Saran, N. G., Lehrach, H., et al. (2007). Gene expression variation in Down's syndrome mice allows prioritization of candidate genes. *Genome Biology*, 8(5), R91. doi:10.1186/gb-2007-8-5-r91
- Summers, B. L., Rofe, A. M., & Coyle, P. (2009). Dietary zinc supplementation throughout pregnancy protects against fetal dysmorphology and improves postnatal survival after prenatal ethanol exposure in mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(4), 591–600. doi:10.1111/j.1530-0277.2008.00873.x
- Sun, Q., Zhong, W., Zhang, W., Li, Q., Sun, X., Tan, X., et al. (2015). Zinc deficiency mediates alcohol-induced apoptotic cell death in the liver of rats through activating ER and mitochondrial cell death pathways. *American Journal of Physiology*, 308(9), G757–66. doi:10.1152/ajpgi.00442.2014
- Sun, S. H., Fu, Y. H., Jou, T. C., Sun, G. Y., & Sun, A. Y. (1987). Ethanol effects on phospholipids and triacylglycerols of rat brain astrocyte cell line. *Alcohol and Alcoholism. Supplement*, 1, 691–695.
- Suzuki, Y., & Cherian, M. G. (2000). Effect of ethanol on brain metallothionein in transgenic mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 24(3), 315–321.
- Szerdahelyi, P., & Kasa, P. (1987). Partial depletion and altered distribution of synaptic zinc in the rat hippocampus after treatment with sodium diethyldithiocarbamate. *Brain Research*, 422(2), 287–294.
- Szewczyk, B. (2013). Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 5, 33. doi:10.3389/fnagi.2013.00033
- Takeda, A. (2000). Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 34(3), 137–148.

- Takeda, A., Minami, A., Seki, Y., & Oku, N. (2004). Differential effects of zinc on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter systems in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 75(2), 225–229. doi:10.1002/jnr.10846
- Takeda, A., & Tamano, H. (2012). Proposed glucocorticoid-mediated zinc signaling in the hippocampus. *Metallomics*, 4(7), 614–618. doi:10.1039/c2mt20018j
- Taylor, K. M., & Nicholson, R. I. (2003). The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1611(1-2), 16–30.
- Thelander, H. E., & Pryor, H. B. (1966). Abnormal patterns of growth and development in mongolism. An anthropometric study. *Clinical Pediatrics*, 5(8), 493–501.
- Thomas, J. D., Garcia, G. G., Dominguez, H. D., & Riley, E. P. (2004). Administration of eliprodil during ethanol withdrawal in the neonatal rat attenuates ethanol-induced learning deficits. *Psychopharmacology*, 175(2), 189–195. doi:10.1007/s00213-004-1806-x
- Timm, F. (1958). [Histochemistry of zinc]. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin*, 47(3), 428–431.
- Todd, A. H. (1934). The Treatment of Pes Cavus: (Section of Orthopaedics). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 28(2), 117–128.
- Tomas, M., Duran, J. M., Lazaro-Dieguez, F., Babia, T., Renau-Piqueras, J., & Egea, G. (2004). Fluorescent analogues of plasma membrane sphingolipids are sorted to different intracellular compartments in astrocytes; Harmful effects of chronic ethanol exposure on sphingolipid trafficking and metabolism. *FEBS Letters*, 563(1-3), 59–65. doi:10.1016/S0014-5793(04)00245-5
- Tomás, M., Fornas, E., Megías, L., Durán, J.-M., Portolés, M., Guerri, C., et al. (2002). Ethanol impairs monosaccharide uptake and glycosylation in cultured rat astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 83(3), 601–12.
- Tomás, M., Marín, P., Megías, L., Egea, G., & Renau-Piqueras, J. (2005). Ethanol perturbs the secretory pathway in astrocytes. *Neurobiology of Disease*, 20(3), 773–84. doi:10.1016/j.nbd.2005.05.012
- Tsacopoulos, M., & Magistretti, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 877–885.
- Tsuda, M., Imaizumi, K., Katayama, T., Kitagawa, K., Wanaka, A., Tohyama, M., & Takagi, T. (1997). Expression of zinc transporter gene, ZnT-1, is induced after transient forebrain ischemia in the gerbil. *The Journal of Neuroscience*, 17(17), 6678–6684.
- Tuerk, M. J., & Fazel, N. (2009). Zinc deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology*, 25(2), 136–143. doi:10.1097/MOG.0b013e328321b395
- U.S. Department of Health and Human Services (2008). Surgeon General releases advisory on alcohol use in pregnancy: Urges women who are pregnant or who may become pregnant to abstain from alcohol.
- Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., & Tomonaga, M. (1991). The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7(2), 337–347.
- Ugazio, A. G., Maccario, R., Notarangelo, L. D., & Burgio, G. R. (1990). Immunology of Down syndrome: a review. *American Journal of Medical Genetics. Supplement*, 7, 204–212.

- Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science*, *291*(5504), 657–661. doi:10.1126/science.291.5504.657
- Vallee, B. L., & Auld, D. S. (1993). Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(7), 2715–2718.
- Vallee, B. L., Coleman, J. E., & Auld, D. S. (1991). Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(3), 999–1003.
- Vallee, B. L., & Falchuk, K. H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews*, *73*(1), 79–118.
- Valles, S., Lindo, L., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (1994). Prenatal exposure to ethanol induces changes in the nerve growth factor and its receptor in proliferating astrocytes in primary culture. *Brain Research*, *656*(2), 281–286.
- Varea, E., Alonso-Llosà, G., Molowny, A., Lopez-Garcia, C., & Ponsoda, X. (2006). Capture of extracellular zinc ions by astrocytes. *Glia*, *54*(4), 304–315. doi:10.1002/glia.20382
- Varea, E., Ponsoda, X., Molowny, A., Danscher, G., & Lopez-Garcia, C. (2001). Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, *110*(1-2), 57–63.
- Ventura, R. E., & Goldman, J. E. (2007). Dorsal radial glia generate olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *The Journal of Neuroscience*, *27*(16), 4297–4302. doi:10.1523/JNEUROSCI.0399-07.2007
- Verkhratsky, A., & Butt, A. (2007). *Glial Neurobiology* (First.). London: John Wiley & Sons Ltd.
- Vernadakis, A. (1996). Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Progress in Neurobiology*, *49*(3), 185–214.
- Vincent, A. L., Weiser, B. A., Cupryn, M., Stein, R. M., Abdoell, M., & Levin, A. V. (2005). Computerized corneal topography in a paediatric population with Down syndrome. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, *33*(1), 47–52. doi:10.1111/j.1442-9071.2005.00941.x
- Volpe, E. P. (1986). Is Down syndrome a modern disease? *Perspectives in Biology and Medicine*, *29*(3 Pt 1), 423–436.
- Volterra, A., & Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature Reviews. Neuroscience*, *6*(8), 626–640. doi:10.1038/nrn1722
- Wallwork, J. C. (1987). Zinc and the central nervous system. *Progress in Food & Nutrition Science*, *11*(2), 203–247.
- Walz, W. (2002). Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia*, *40*(1), 1–10. doi:10.1002/glia.10125
- Wang, F., Kim, B.-E., Petris, M. J., & Eide, D. J. (2004). The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(49), 51433–51441. doi:10.1074/jbc.M408361200
- Wang, F., Zhou, Y., Fu, B., Wu, Y., Zhang, R., Sun, R., *et al.* (2014). Molecular signatures and transcriptional regulatory networks of human immature decidual NK and mature peripheral NK cells. *European Journal of Immunology*, *44*(9), 2771–2784. doi:10.1002/eji.201344183
- Wang, Z., Danscher, G., Kim, Y. K., Dahlstrom, A., & Mook Jo, S. (2002). Inhibitory zinc-

- enriched terminals in the mouse cerebellum: double-immunohistochemistry for zinc transporter 3 and glutamate decarboxylase. *Neuroscience Letters*, 321(1-2), 37–40.
- Wang, Z.-Y., Stoltenberg, M., Huang, L., Danscher, G., Dahlstrom, A., Shi, Y., & Li, J.-Y. (2005). Abundant expression of zinc transporters in Bergman glia of mouse cerebellum. *Brain Research Bulletin*, 64(5), 441–448. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.10.001
- Wellenreuther, G., Cianci, M., Tucoulou, R., Meyer-Klaucke, W., & Haase, H. (2009). The ligand environment of zinc stored in vesicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(1), 198–203. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.074
- Wenzel, H. J., Cole, T. B., Born, D. E., Schwartzkroin, P. A., & Palmiter, R. D. (1997). Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12676–12681.
- White, C. W., Nguyen, D. H., Suzuki, K., Taniguchi, N., Rusakow, L. S., Avraham, K. B., & Groner, Y. (1993). Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc superoxide dismutase. *Free Radical Biology & Medicine*, 15(6), 629–636.
- Windham, G. C., Von Behren, J., Fenster, L., Schaefer, C., & Swan, S. H. (1997). Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*, 8(5), 509–514.
- Winegar, B. D., & Lansman, J. B. (1990). Voltage-dependent block by zinc of single calcium channels in mouse myotubes. *The Journal of Physiology*, 425, 563–578.
- Wisniewski, K., Dambaska, M., Sher, J. H., & Qazi, Q. (1983). A clinical neuropathological study of the fetal alcohol syndrome. *Neuropediatrics*, 14(4), 197–201. doi:10.1055/s-2008-1059578
- Wolburg, H., & Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 75–88. doi:10.1007/s00401-009-0627-8
- Wozniak, D. F., Hartman, R. E., Boyle, M. P., Vogt, S. K., Brooks, A. R., Tenkova, T., *et al.* (2004). Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiology of Disease*, 17(3), 403–414. doi:10.1016/j.nbd.2004.08.006
- Yenigun, A., Ozkinay, F., Cogulu, O., Coker, C., Cetiner, N., Ozden, G., *et al.* (2004). Hair zinc level in Down syndrome. *Down's Syndrome, Research and Practice*, 9(2), 53–57.
- Yokoyama, M., Koh, J., & Choi, D. W. (1986). Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 71(3), 351–355.
- Yoon, Y., Torok, N., Krueger, E., Oswald, B., & McNiven, M. A. (1998). Ethanol-induced alterations of the microtubule cytoskeleton in hepatocytes. *The American Journal of Physiology*, 274(4 Pt 1), G757–66.
- Young, C., Roth, K. A., Klocke, B. J., West, T., Holtzman, D. M., Labruyere, J., *et al.* (2005). Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 20(2), 608–614. doi:10.1016/j.nbd.2005.04.014
- Yu, S. P., & Choi, D. W. (1997). Na(+)-Ca²⁺ exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *The European Journal of*

- Neuroscience*, 9(6), 1273–1281.
- Yu, T., Li, Z., Jia, Z., Clapcote, S. J., Liu, C., Li, S., *et al.* (2010). A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Human Molecular Genetics*, 19(14), 2780–2791. doi:10.1093/hmg/ddq179
- Zalewski, P. D., Forbes, I. J., & Betts, W. H. (1993). Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *The Biochemical Journal*, 296 (Pt 2, 403–408.
- Zalewski, P. D., Forbes, I. J., Giannakis, C., & Betts, W. H. (1991). Regulation of protein kinase C by Zn(2+)-dependent interaction with actin. *Biochemistry International*, 24(6), 1103–1110.
- Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., & Sensi, S. L. (2009). Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7), 346–355. doi:10.1016/j.tips.2009.05.002
- Zhang, L., & Goldman, J. E. (1996). Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology*, 370(4), 536–550. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960708)370:4<536:AID-CNE9>3.0.CO;2-5
- Zhao, J., Bertoglio, B. A., Devinney, M. J. J., Dineley, K. E., & Kay, A. R. (2009). The interaction of biological and noxious transition metals with the zinc probes FluoZin-3 and Newport Green. *Analytical Biochemistry*, 384(1), 34–41. doi:10.1016/j.ab.2008.09.019
- Zhou, F. C., Sari, Y., & Powrozek, T. A. (2005). Fetal alcohol exposure reduces serotonin innervation and compromises development of the forebrain along the serotonergic pathway. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29(1), 141–149.

VIII. PUBLICACIONES

Artículos derivados de esta tesis:

Ballestin, R., Molowny, A., Marin, M. P., Esteban-Pretel, G., Romero, A. M., Lopez-Garcia, C., *et al.* (2011). Ethanol reduces zincosome formation in cultured astrocytes. *Alcohol and Alcoholism*, 46(1), 17–25. doi:10.1093/alcalc/agq079

Ballestin, R., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., Nacher, J., Lopez-Hidalgo, R., Gilabert-Juan, J., *et al.* (2014). Astrocytes of the murine model for Down Syndrome Ts65Dn display reduced intracellular ionic zinc. *Neurochemistry International*, 75, 48–53. doi:10.1016/j.neuint.2014.05.013

PHARMACOLOGY AND CELL METABOLISM

Ethanol Reduces Zincosome Formation in Cultured Astrocytes

Raúl Ballestín¹, Asunción Molowny¹, María Pilar Marín², Guillermo Esteban-Pretel², Ana María Romero², Carlos Lopez-García¹, Jaime Renau-Piqueras² and Xavier Ponsoda^{1,*}

¹Biología Celular, Universitat de València, Avda. Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain and ²Biología y Patología Celular, Hospital La Fe, Avda. Campanar 21, 46009 Valencia, Spain

*Corresponding author: Tel.: +34-96-354-3242; Fax: +34-96-354-3404; E-mail: ponsoda@uv.es

(Received 20 July 2010; in revised form 21 October 2010; accepted 26 October 2010)

Abstract — Aims: Zinc is an ion that participates in basic cellular and tissular functions. Zinc deficiency is present in many physiological and health problems affecting most body organs, including the brain. Among the circumstances involved in zinc deficiency, ethanol consumption is probably one of the most frequent. A dietary zinc supplement has been proposed as possibly being an efficient method to palliate zinc deficiency. Astrocytes form part of the hematoencephalic barrier, and they are apparently implicated in the homeostasis of the neuronal medium. In this work, we analyze the effect of ethanol on extracellular zinc management by rat astrocytes in culture. Methods: Intracellular levels of ‘free zinc ions’, in controls and 30 mM ethanol-treated astrocytes, were visualized by using the zinc fluorochrome TSQ. Cytoplasmic fluorescence and zincosome formation were measured after adding extracellular 50 μ M ZnSO₄ to cell monolayers. Zincosomes were also observed at the electron microscopy level. Results: Exposure to ethanol for 7 days lowered the basal zinc levels of astrocytes by ~30%. This difference was consistently maintained after the zinc pulse. Zinc ions were confined to bright fluorescent particles, the ‘zincosomes’, which appeared to be formed by the endocytic pathway. Zincosomes were less abundant in alcohol-treated cells, indicating a deficit in endocytoses as the origin of low zinc intake in astrocytes after ethanol treatment. Conclusions: Ethanol reduces both intracellular ionic zinc levels and extracellular zinc uptake, resulting in poorer zincosome formation. Given the endocytic nature of zincosomes, the effect of ethanol on membrane trafficking is apparently the origin of this deficit.

INTRODUCTION

During pregnancy, ethanol consumption causes a neurotoxic/dysmorphogenic syndrome that includes craniofacial malformations that are associated with a variety of neurobehavioral disturbances ranging from hyperactivity/attention deficit disorder and learning disabilities in childhood (Streissguth and O’Malley, 2000) to major depressive and psychotic disorders in adulthood. In addition, exposure to ethanol causes a variety of anomalies in the developing brain, including neuronal-glial heterotopias, cerebellar dysplasia, agenesis of the corpus callosum, hydrocephalus and microcephaly (Guerra *et al.*, 2009; Streissguth *et al.*, 1994). These toxic effects are indicative of aberrant migration, decreased proliferation and neural cell death (Goodlett *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2009; Streissguth *et al.*, 1994). This syndrome is known as fetal alcohol syndrome (FAS). No single mechanism has been sufficient to account for these varying effects; it is likely that multiple factors are involved, and a number of mechanisms have been suggested (Goodlett *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2001; Martínez and Egea, 2007). One such mechanism indicates that ethanol perturbs the cytoskeleton and protein trafficking, thus ethanol treatment substantially impairs endocytosis, exocytosis and nucleocytoplasmic traffic in rat astrocytes in primary cultures (Marín *et al.*, 2008; Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2002, 2004, 2005).

Zinc is an essential trace element that is critical for a large number of structural proteins, enzymatic processes and transcription factors. The importance of the role of zinc in the growth and development, including brain development, of mammals was recognized in the first third of the 20th century (Todd *et al.*, 1934) and was observed in humans in 1963 (Prasad, 1991). Since then, the functions of zinc and the effects of its deficiency on the brain and other organs have been continuously studied (Bitanhirwe and

Cunningham, 2009). Thus, low levels of zinc, prolonged in time and at different levels, can cause fatal or mild effects. These effects appear in a wide spectrum fashion depending on the magnitude of the deficiency and, more importantly, the variety of clinical manifestations seen in zinc deficiency illustrates the numerous roles that zinc plays in the body (Tuerk and Fazel, 2009). In addition, ethanol consumption during gestation can cause zinc deficiency, as demonstrated in pregnant mothers, which was directly related to the expression of FAS (Flynn *et al.*, 1981). These severe effects were found in rodents exposed to alcohol or to a low-zinc diet during pregnancy (Carey *et al.*, 2000; Record *et al.*, 1986) and, under some experimental conditions, zinc treatment has been found to reverse severe ethanol effects on mouse fetuses (Summers *et al.*, 2009). Under other conditions, however, ethanol effects on neuronal loss did not lower with zinc supplementation (Chen *et al.*, 2001). Therefore, the avoidance of zinc supplementation is recommended in some cases as it may increase morbidity or lead to further deterioration; even very high intakes may result in the deficiency of other metals or in growth retardation (Tuerk and Fazel, 2009).

The functions of zinc in biological systems can be divided into three main categories: structural, catalytic and regulatory. ‘Structural zinc’ in cells participates in protein folding and macromolecular stabilization, producing active molecules containing structures such as zinc fingers by, for example, stabilizing some enzymes such as the antioxidant superoxide dismutase (Roberts *et al.*, 2007). ‘Catalytic zinc’ is a component of the catalytic site of hundreds of metalloenzymes (Vallee and Falchuk, 1993). ‘Regulatory zinc’ acts on a number of biologic processes, including gene regulation (Cousins, 1994; Dalton *et al.*, 1997). Zinc present in tissues is delivered between cells or cellular compartments according to cell’s needs to maintain zinc homeostasis (Sekler *et al.*, 2007).

Despite the broad distribution of zinc in biological systems, only the ionic zinc fraction may be detected by histochemical techniques. In the CNS, some neurons accumulate zinc ions inside synaptic vesicles (Frederickson and Danscher, 1990), that is, 'synaptic zinc' which is co-released with glutamate during synaptic transmission. In the extracellular space, zinc ions modulate different types of receptors, including the amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainate receptor, *N*-methyl-D-aspartate and γ -aminobutyric acid receptors and voltage-gated ion channels (Frederickson *et al.*, 1989; Izumi *et al.*, 2006; Smart *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 2004). However, the excessive presence of free zinc in the extracellular space can induce neuronal death (Frederickson *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 1999). This is precisely why nervous tissue should maintain extracellular zinc levels and why astrocytes play an important role in the maintenance of the zinc homeostasis in the CNS. This role is developed by these cells mainly due to their lower sensitivity to a toxic zinc insult compared with neurons (Dineley *et al.*, 2000; Sheline *et al.*, 2004), its capacity to uptake extracellular zinc (Kim *et al.*, 2009; Varea *et al.*, 2006), and its capacity to chelate extracellular zinc by releasing metallothionein (Chung *et al.*, 2008). Therefore, the analysis of those factors that might modulate or alter this function is of great interest.

Extracellular zinc ions may be captured by cells and confined in vesicles, which have been named 'zincosomes' (Beyersmann and Haase, 2001). Zincosomes have been detected in many cell types, including yeasts (Eide, 2006). Although their nature is still unclear, they appear to correlate with endocytic activity (Varea *et al.*, 2006) which, on the other hand, may be altered by ethanol.

The aims of this study are to analyze the relevance of chronic alcohol exposure on cultured rat astrocytes exposed to ethanol for 7 days (proliferation period) and then to study its ability to uptake the extracellular zinc added to the culture medium.

MATERIAL AND METHODS

Primary culture of astrocytes

To prepare the culture of astrocytes, Wistar rat fetuses (E21) were used. All the animal experiments were approved by the appropriate institutional review committee (Comité Ético de Experimentación Animal, ref: SAF2005-00615) and were conducted in accordance with the guidelines approved by the European Communities Council Directive (86/609/ECC) and by Spanish Royal Decree 1201/2005.

After decapitation, brain hemispheres were dissected under sterile conditions, washed with ice-cold sterile phosphate-buffered saline and meninges were removed. Samples were placed in a centrifuge tube in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) culture medium and were mechanically disrupted by aspirating 10 \times with a pipette. The resulting homogenate was vigorously mixed with a vortex to kill neurons. Afterward, the individual cell suspension was obtained by filtering the homogenate through nylon membranes with a 80 μ m pore. Cell suspension was diluted and seeded over glass coverslips in DMEM supplemented with 20% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 1% antibiotics (penicillin-streptomycin solution; Miñana *et al.*, 1998; Renau-Piqueras *et al.*, 1989). In some cases, ethanol was added to the culture medium and adjusted to a concentration

of 30 mM (138 mg/dl, ethanol evaporation after 24 h was 10–20%) which is the equivalent to the ethanol concentration in the blood of pregnant chronic drinkers, and is considered to be a moderate alcohol consumption (Eckardt *et al.*, 1998). Cultures were maintained in the incubator at 37°C with 5% CO₂. Under these conditions, cells grew quickly as a result of their high proliferative activity during the first week of culture (Renau-Piqueras *et al.*, 1989). In addition, astrocytes release several neurotrophic factors during this period, and express their corresponding receptors (Lu *et al.*, 1991; Vallés *et al.*, 1994). The medium was replaced every 2 days with a regular medium or with a medium containing ethanol. Assays were performed on culture Day 7.

The purity of astrocyte cultures was assessed using an anti-GFAP monoclonal antibody. Contamination by neurons was evaluated using an anti-MAP-2 antibody. All the experiments were approved by the appropriate institutional review committee and were performed in compliance with the European Community Directive for the Welfare and Use of Laboratory Animals.

Ionic zinc staining with FluoZin-3 or with Newport Green

Both the control and alcohol-exposed astrocytes were incubated in free serum medium containing 2 μ M ionic zinc fluorochrome FluoZin-3 (AM cell permeant; Invitrogen, Cat. No. F-24195) or 5 μ M Newport Green (DCF diacetate cell permeant; Invitrogen, Cat. No. N-7991) in DMEM for 30 min in the cell incubator. After washing with fresh medium, cells were then incubated with or without zinc, and were visualized by fluorescence.

Ionic zinc staining with TSQ

Control and alcohol-exposed astrocytes were incubated in free serum medium containing 50 μ g/ml ionic zinc fluorochrome TSQ (*N*-(6-methoxy-8-quinolyl)-*p*-toluenesulfonamide; Invitrogen, Cat. No. M-688) in DMEM for 10 min in the cell incubator. After washing with fresh medium, cells were visualized with the fluorescence microscope (excitation wavelength 360 nm, emission wavelength 420 nm).

Endosomes staining with FM 1–43

Astrocytes were incubated in free serum medium containing 10 μ M FM 1–43 (*N*-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino)styryl)pyridinium dibromide; Invitrogen, Cat. No. T-35356) in medium for 10 min in the cell incubator. After washing with fresh medium, cells were visualized with the fluorescence microscope (excitation wavelength 510 nm, emission wavelength 626 nm).

Extracellular zinc uptake

Cells were incubated in free serum medium containing 50 μ M ZnSO₄ for 10 min in the cell incubator, followed by a wash with fresh medium. This treatment was usually preceded by zinc depletion with TPEN (tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine; Invitrogen, Cat. No. T-1210) for 20 min to increase both cellular zinc requirements and extracellular zinc uptake.

Image capture, processing and analysis

All the images were captured with an Olympus microscope BX50WI, equipped with a Hamamatsu ORCA digital camera

and controlled with the Aquacosmos software. Images were further processed and analyzed with the Aquacosmos software. Ten images from both the control and treated cultures were processed in parallel to allow better observations of the results in an experiment. An area analysis of cell fluorescence at a low magnification ($\times 10$) was done in random images of the cell monolayers present in the image after subtracting the background fluorescence obtained in the empty areas (without cells) of each image. Particle counting was performed manually on all the cells present in random images at a high magnification ($\times 60$), and the results were expressed as particles/cell surface. Monolayer and cell surface imaging was automatically obtained from bright field images (i.e. interferential contrast illumination) in parallel to fluorescence images.

Electron microscopy processing

Cell monolayers were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 30 min, and with 2% osmium tetroxide in water for 1 h. Then, samples were dehydrated with ethanol and counterstained with uranyl acetate. Finally,

they were embedded in TAAB resin (T002, Taab Laboratories, UK). Cells were sectioned at $2\ \mu\text{m}$ and stained with toluidine blue. Selected semi-thin sections were re-embedded and trimmed for ultrathin sectioning. Ultrathin sections were stained with lead citrate and examined in a Jeol JEM-1010 electron microscope (Varea *et al.*, 2006).

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SD. Statistical significance was accepted when we obtained a *P*-value of <0.05 using Student's *t*-test.

RESULTS

Choice of the zinc fluorochrome

Control cultured astrocytes were used to evaluate the adequacy of the most commonly used zinc fluorochromes in this study, i.e. FluoZin-3, Newport Green and TSQ. Cells were incubated first with TPEN and then with the fluorochrome

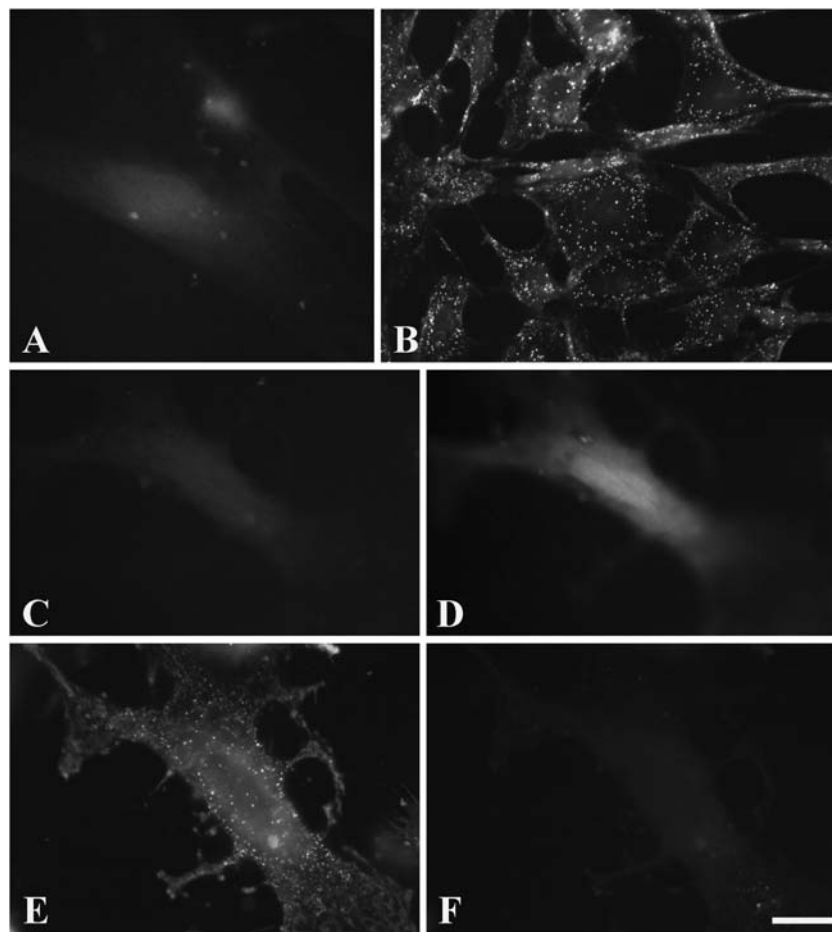


Fig. 1. Zinc uptake detection in cultured rat astrocytes using different fluorochromes. Cultured astrocytes were incubated with TPEN followed by Newport Green. Fluorescence was very low and cell morphology could not be properly detected (A). After the $50\ \mu\text{M}$ ZnSO_4 incubation, cell fluorescence was virtually the same with a non-significant increase (C). Incubation of cells with the zinc ionophore, pyriithione, resulted in a homogenous and significant increase in cell fluorescence after 2–3 min (D). Later, TSQ was added to the cells, resulting in a labeling that included both the cytoplasm and the formation of brilliant structures, named zincosomes (E). Finally, the addition of TPEN to the cultures produced a zinc quelation, which was observed as reduced fluorescence (F), similarly to the initial conditions. (B) shows the typical TSQ fluorescence of astrocytes after 15 min incubation with $50\ \mu\text{M}$ ZnSO_4 . Cells show diffuse cytoplasmic fluorescence, with a greater intensity close to the nucleus. Brilliant zincosomes are present all around the cell, the soma and the cellular expansions (Scale bar: A and C–F = $20\ \mu\text{m}$; B = $30\ \mu\text{m}$).

Fluozin-3 or Newport Green. Once the fluorochromes had been hydrolyzed by cytoplasm esterases, the medium was replaced with fresh medium 30 min later, and pictures were taken (Fig. 1A). Afterward, cells were incubated for 15 min in a medium containing 50 μM ZnSO_4 . Once again, pictures of the cells were taken. The results show that neither Fluozin-3 nor Newport Green could measure a significant increase; only a weak fluorescence was detected, and the cell morphology was not easily observed (Fig. 1C).

To prove that the cell loading of fluorochromes and zinc was accomplished in accordance with normal circumstances, cells were treated with 50 μM pyrithione in the presence of 50 μM ZnSO_4 (Fig. 1C–D). Increased cell fluorescence was clearly observed, meaning that no zinc was present in the cytoplasm until a zinc ionophore was added.

This image was quite different from the typical staining of astrocytes loaded with zinc and stained with TSQ (Fig. 1B). After renewing the medium, TSQ was added to the same cells which produced clear results: cells became fully fluorescent and a lot of zincosomes appeared (Fig. 1E). This means that these zincosomes were present but not stained until TSQ was added. Finally, cells were incubated with TPEN (zinc quelator agent) and the fluorescence dropped to the initial values (Fig. 1F).

Ionic zinc content of cultured astrocytes lowers in ethanol-treated cells

After 7 days of incubation, monolayers were stained with TSQ to evaluate the basal levels of zinc. Fluorescence was not always uniformly distributed because we could observe cells of different fluorescent intensities in the same field. To overcome this, images were taken randomly in each case. In the controls, cell basal TSQ fluorescence was low and diffuse, but enough to be detected in both the cytoplasm and

nucleus. In the ethanol-treated cultures, the basal TSQ fluorescence was hardly detectable (Fig. 2). However, this fluorescence could be measured, with the result of ethanol reducing the fluorescence of the control levels (100 ± 40) to 28 ± 24 UAF (Student's *t*-test, $P < 0.01$, $n = 6$).

Extracellular zinc uptake by cultured astrocytes is impaired by ethanol

Both the control and ethanol-treated cells were incubated for 15 min in 50 μM ZnSO_4 , and their ability to capture zinc was determined using TSQ as a zinc marker. Typically, fluorescence considerably increased compared with the basal levels, thus allowing the examination of cellular morphology under fluorescence observation (Fig. 1B).

Total cell fluorescence was analyzed in both the control and alcohol-exposed monolayers by using low-magnification images (Fig. 3A and D), which resulted in a significant decrease (around 80%) of the cell fluorescence in those cells exposed to ethanol (control 129.83 ± 81.29 , ethanol 37.75 ± 19.24 ; Student's *t*-test $P < 0.01$, $n = 10$). At a greater magnification (Fig. 3B and D–F), the most remarkable result was a >70% reduction in the density of the zincosomes present in the cytoplasm of the ethanol-treated cells compared with the controls (control 29.15 ± 13.13 , ethanol 7.48 ± 3.20 ; Student's *t*-test $P < 0.01$, $n = 6$).

This poorer zincosome formation was not homogeneous. In the flatter, more extended cells (Fig. 3C and F), zincosomes can be distributed into two groups according to their size: large, more brilliant under UV illumination; small, less brilliant. When applying this distribution, the small zincosome density analysis of the peripheral zone of cells gave greater and significant differences between controls and ethanol cultures (control 97.15 ± 6.74 , ethanol 85.99 ± 16.89 ; Student's *t*-test $P < 0.05$, $n = 10$).

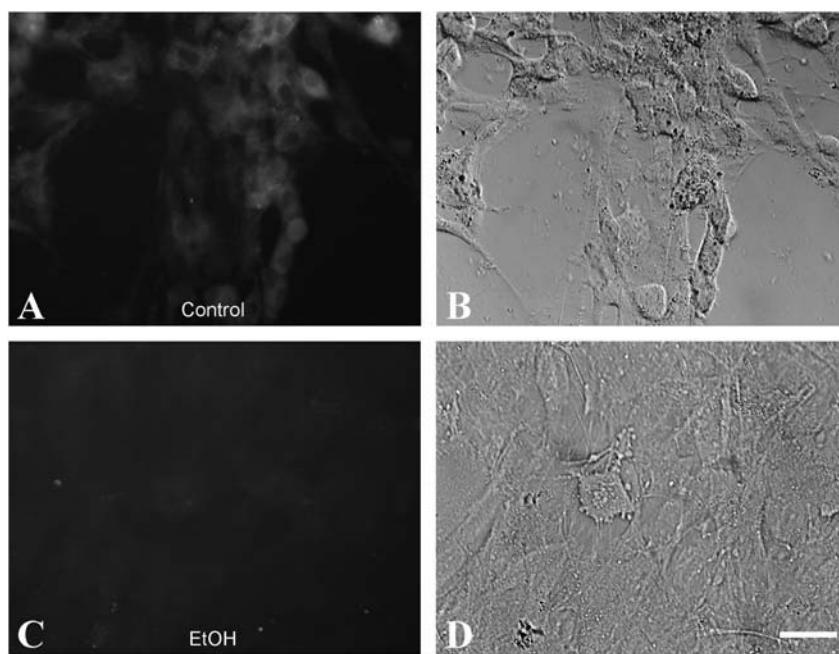


Fig. 2. Basal levels of zinc in cultured astrocytes visualized with TSQ. Cells were maintained for 7 days under control conditions (A–B) or with 30 mM ethanol (C–D). The fluorescence of cells was higher in the controls (A) compared with the ethanol-treated cells (C). Cell monolayers did not present any noticeable morphology alterations between the controls (B) and the treated cells (D). (Scale bar: 30 μm).

Zincosomes have an endocytic origin

TSQ staining of zinc was performed simultaneously with the staining for endocytic vesicles with the fluorochrome FM 1–43. The structures marked with each fluorochrome were distributed in the cytoplasm in a non-regular pattern (Fig. 4). This heavy punctate labeling made the analysis of the co-localization of both markers difficult. However, some less heavily marked cells with a few zincosomes allowed the simple observation of the results. In these cases, some endocytic vesicles were also marked with the zinc fluorochrome TSQ (horizontal arrowheads in Fig. 4).

Ultrastructural characterization of zincosomes

The ultrastructure of the zincosomes was analyzed in selected cells after zinc loading and TSQ staining. Positive cells with a moderate density of zincosomes were fixed, embedded, sectioned and observed by transmission electron microscopy.

The cultured astrocytes grown on coverslips were incubated with zinc and stained with TSQ, and they showed

many zincosomes of different sizes (Fig. 5A). The biggest ones usually had refractive properties and were easily detected under light microscopy (Fig. 5B and D). After inclusion, cells were sectioned and the resulting series of ultrathin sections was analyzed. The fluorescent zincosomes were localized in the electron microscopy as empty vesicles with an approximate diameter of 450 nm (Fig. 5C, E and F).

Cultured astrocytes showed a very high content of vesicles near the zincosomes, and occasionally some of them were fixed during the fusion process with zincosomes (Fig. 6A and B), while others were budding from the plasma membrane (Fig. 6C).

DISCUSSION

Zinc histochemistry

Although this study only deals with a fraction of zinc that is histochemically detectable, i.e. the 'ionic' or 'vesicular' zinc pool which may be evidenced with TSQ (Frederickson *et al.*, 1992), it seems clear that it is affected by alcohol exposure.

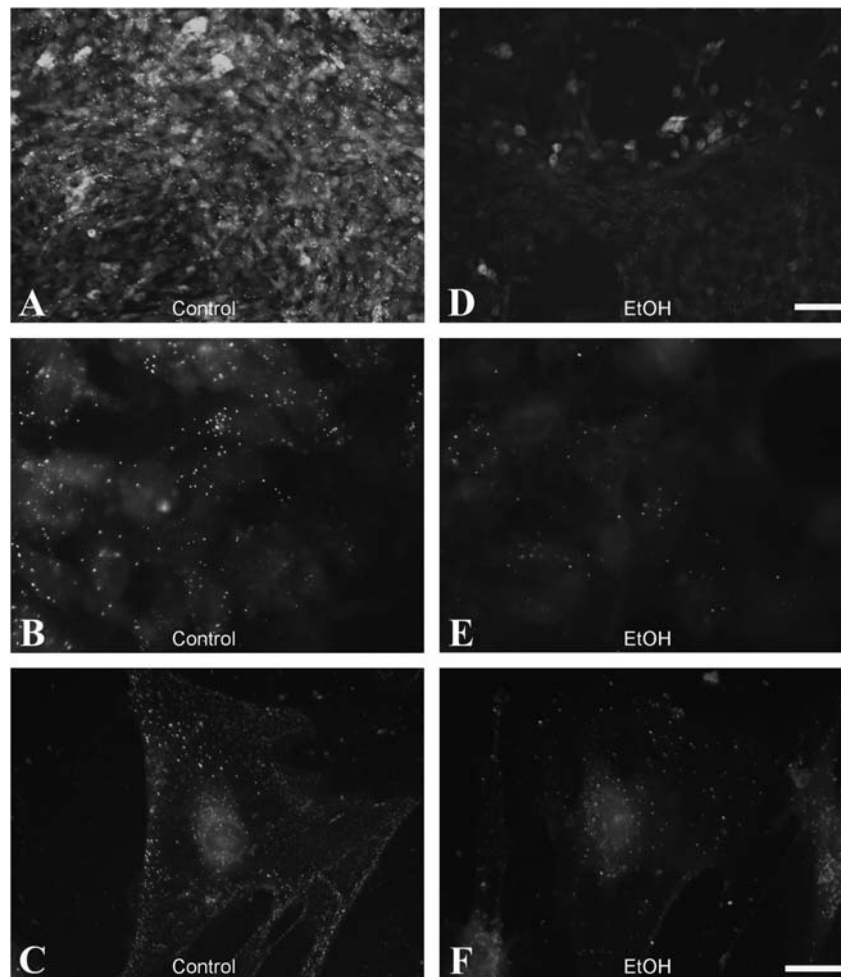


Fig. 3. Effect of ethanol on the TSQ fluorescence of the cultured astrocytes after 15 min incubation with 50 μM ZnSO_4 . At a low magnification (A–D), the control cultures (A) showed greater fluorescence than the ethanol-treated cells (D). At a high magnification (B, C, E, and F), the control cultures (B and C) displayed a greater brilliant zincosomes density than the ethanol-treated cells (E and F). In flatter, more isolated cells (C and F), the control cells (C) were seen to have lots of both large and small zincosomes. While the large zincosomes appeared mainly near the nucleus, the small zincosomes were distributed more homogeneously around the cell. On the other hand, the ethanol-treated cells (F) had fewer zincosomes and, among them, the reduction of the small zincosomes was more significant. (Scale bars: A and D = 100 μm ; B, C, E, and F = 20 μm).

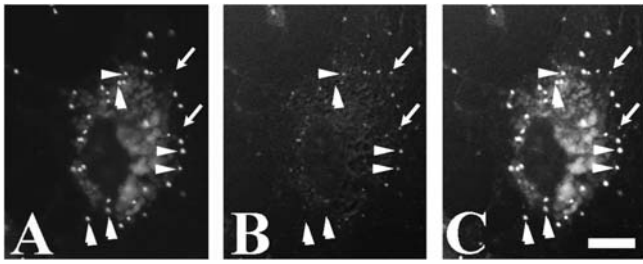


Fig. 4. Colocalization of TSQ zinc fluorescence and FM 1–43-marked early endosomes. Zincosomes (A) appear as brilliant structures, randomly distributed within cells (vertical and horizontal arrowheads). Early endosomes (B) are also irregularly distributed within cells (horizontal arrowheads and arrows). The resulting merged image (C) shows the presence of some double-marked structures (horizontal arrowheads) coexisting with other single-stained ones (vertical arrow heads, TSQ-zinc; arrows, endosomes) (Scale bar: 10 μ m).

At a given time, this zinc pool is thought to be ~15% of the total zinc content in the brain (Szerdahelyi and Kasa, 1987). Most ‘structural’ or ‘metabolic’ zinc may neither be imaged nor histochemically detected. There are some zinc fluorochromes, among which, and in addition to TSQ, the most frequently used are probably FluoZin-3 or Newport Green, which prove useful for detecting cytoplasmic levels of zinc under different experimental conditions (Canzoniero *et al.*, 1997; Gee *et al.*, 2002). However, astrocytes seem to have

other ways than cytoplasmic means to acutely handle extra-cellular added zinc (Fig. 1; Varea *et al.*, 2006). Finally, the following experiments were performed only with TSQ to better study the zinc alterations after cell treatments.

The fluorescence emission spectrum of zinc-TSQ partially overlapped with that of intracellular NADH (Shuttleworth, 2010), which could interfere in the study by giving overestimated fluorescence values. Under our experimental conditions, however, cells untreated either with TSQ or zinc show very low levels of fluorescence, which led us to rule out any doubt of the specific origin of fluorescence. The experimental data clearly indicate that ethanol exposure disturbs the intracellular zinc homeostasis in the cultured astrocytes in terms of both the maintenance of the basal levels of zinc and the uptake ability of the exogenous zinc added to the culture.

Zinc basal levels in astrocytes: control versus ethanol

Ethanol can cause severe disorders in development (FAS) that affect the development of the CNS. The glial cells in this syndrome are also affected, including the structural and functional abnormalities in gliogenesis and in glial–neuronal interactions, which suggests a role of a direct target on ethanol toxicity during ethanol-induced developmental brain abnormalities, and not a secondary effect (Guerra and Renau-Piqueras, 1997; Guerra *et al.*, 2001). The toxic effects of ethanol on astrocytes may be important not only during

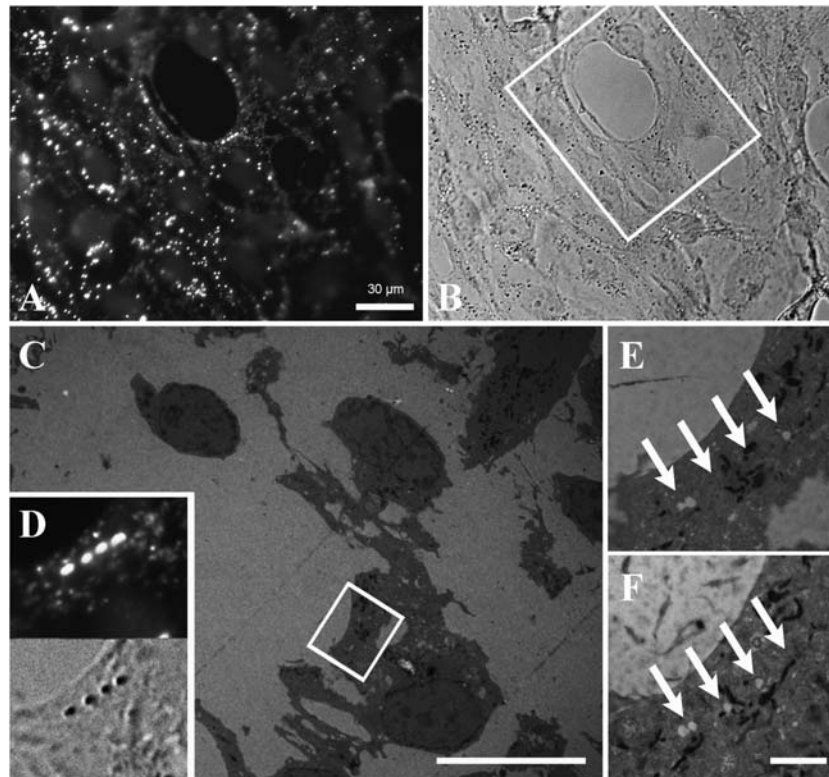


Fig. 5. Subcellular identification of zincosomes. (A) Fluorescence demonstration with the TSQ of zincosomes in the cultured astrocytes incubated with 50 μ M ZnSO₄. (B) Bright field of the same area as (A); observe how some bright spots (zincosomes) in (A) are dark spots in (B). The squared area corresponds to (C). (C) Ultrathin #14 including the cell with the four-selected zincosomes to be studied. The squared area corresponds to (D), (E) and (F). (D) Magnification of (A) and (B) including the four zincosomes analyzed here and in Fig. 6. (E) Magnification of C corresponding to the squared area. Arrows point to two of the four zincosomes of (D) present in ultrathin #14. (F) Magnification of the area corresponding to (E) observed in ultrathin #16. Here, three of the four zincosomes are present. Observe how the left one is doubled, which can be seen in (D). (Scale bars: C = 20 μ m; E and F = 2 μ m).

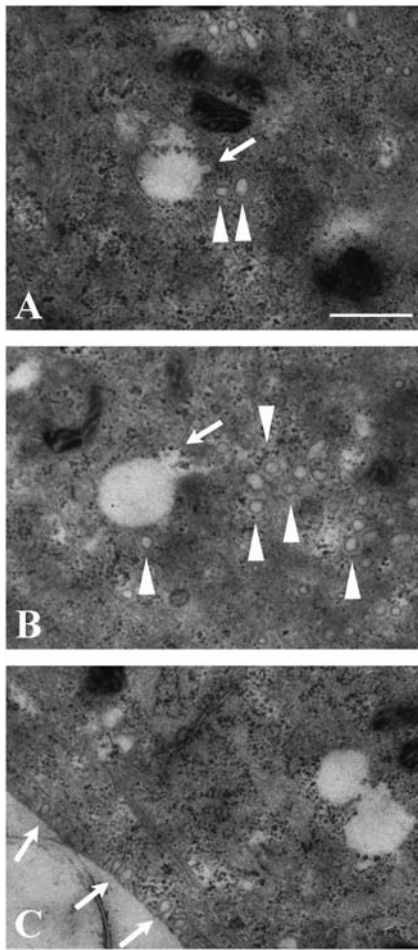


Fig. 6. Subcellular identification of zincosomes. (A) Zincosome in ultrathin #17 showing a vesicle fusion (arrow) and a pair of endocytic vesicles close to it (arrow heads). (B) Zincosome in ultrathin #19 showing a vesicle fusion (arrow) together with many near endocytic vesicles (arrow heads). (C) Double zincosome in ultrathin #16 clearly showing several endocytic vesicles, which were almost detached from the plasma membrane (arrows). (Scale bar: A–C = 0.5 μ m).

development, but also during the whole life span because their functionality can be affected after alcohol exposure in cellular trafficking, including endocytosis (Megías *et al.*, 2000), nucleocytoplasmic transport (Marín *et al.*, 2008) and secretion (Tomás *et al.*, 2005). All these functions are important in the maintenance of the homeostasis of the CNS which, when altered, can cause the onset of different neurodegenerative pathologies, many of which relate to a metal ion dyshomeostasis that could be treated with chelating agents (Bolognin *et al.*, 2009; Zatta *et al.*, 2009).

Other than neurobehavioral development impairment, clinical or experimental observations after alcohol consumption show the reduction of zinc levels both in plasma and in several tissues (Carey *et al.*, 2000; Florianczyk, 2000; Murillo-Fuentes *et al.*, 2010). These effects are well reflected in cultured astrocytes as a reduction of the cytoplasmatic 'basal pool of free zinc ions', which seems to be loosely bound to proteins/macromolecules, as evidenced by the global zinc marker TSQ.

When we prolonged incubations to 7 days in culture, astrocytes were not severely affected by ethanol treatment

(data not shown), which reflects good morphology and spread over the culture plate. Thus, there was neither an apparent severe loss of cell viability nor cell proliferation inhibition. This model became a good candidate to study zinc management, as an approximation to the *in vivo* condition, after a toxic insult like continuous ethanol exposure, as previously observed (Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2002).

The capture of supplemented zinc

Low levels of zinc have been related to different abnormalities, both physiological and developmental (Sandstead *et al.*, 2000). The most obvious therapy in these cases seems to be dietary zinc supplementation to either recover or reduce these effects. In some cases, during pregnancy, these pathologies seem to be ameliorated in newborns (Shah and Sachdev, 2006). However, this treatment has not always provided positive results (Carey *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2001; Shah and Sachdev, 2006).

Our experiments are in accordance with these observations since ethanol reduced not only the basal levels of cultured astrocytes, but also the ability of cells to uptake extracellular zinc measured by total fluorescence and by zincosome formation. Thus, cultured astrocytes seem to have the cellular machinery to either recover intracellular stores or clean extracellular zinc accumulation under control conditions. Yet this machinery in the alcohol-treated cells seems to be affected in such a way that it does not permit the intake of extracellular zinc at the same rates as those observed in the control cells.

Accordingly, since astrocytes control the CNS barriers, it seems reasonable to propose that zinc entry and bioavailability to neurons would be very low or not enough depending on the degree of impairment of zinc uptake in astrocytes by ethanol.

Zincosomes

The most prominent effect of ethanol treatment has been the disturbing effects on the formation of zincosomes. Zincosomes are of different sizes; some are larger and are highly brilliant, while others are smaller and less brilliant, and more abundant (Fig. 1, 3C). This may explain why those cells that are loaded with zinc actually increase fluorescence at a low magnification, while cytoplasmic fluorescence does not change even at a higher magnification (Fig. 3).

Zincosomes are transitory highly mobile zinc-enriched particles whose ultrastructure still remains elusive (Wellenreuther *et al.*, 2009). In our experience, we have encountered many problems to obtain a proven zincosome under electron microscope observation due to its global distribution within cells and its lack of a singular structure. Here for light and electron microscope correlations, we used the topographical correlation of selected fluorescent zincosomes. With this approach, only the large, brilliant zincosomes, as seen with TSQ, were unequivocally found (Fig. 5). The smaller TSQ-stained zincosomes (Fig. 1B and 5A) were probably seen at the ultrastructural level, like those small ones which were probably near the fusion with the large identified zincosomes.

The endocytic origin of zincosomes is evidenced by the overlap labeling with FM 1–43, a marker of endocytosis. Additionally, the ultrastructural study of astrocytes revealed the presence of abundant endocytic vesicles in the

surroundings of identified zincosomes, and even showed how some of them fuse with the 'zincosome vacuolar area', thus confirming previous results (Colvin *et al.*, 2006).

Accordingly, ethanol effects on exogenous zinc uptake may relate to a reduction of the endocytic activity or to a disruption of the implicated molecular machinery that binds and helps zinc enter the cell. This reduction of plasma membrane activity was described for all the endocytic processes in astrocytes (Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2004), and also for cultured neurons (Marín *et al.*, 2010), which could be predicted for zinc uptake. In this aspect, previous studies have indicated that sucrose, a clathrin-dependent endocytosis inhibitor (Heuser and Anderson, 1989), reduces the uptake of zinc ions by astrocytes, suggesting that the endocytosis of zinc could be clathrin-mediated (Varea *et al.*, 2006). This process depends on the integrity of both microtubules and the actin cytoskeleton which, as previously demonstrated, is clearly affected, together with the endocytosis, by chronic ethanol exposure of astrocytes (Marín *et al.*, 2008; Megías *et al.*, 2000; Tomás *et al.*, 2004, 2005). Therefore, this deleterious effect of ethanol could also be involved in the decrease of zinc intake in alcohol-exposed astrocytes. In addition, the cytoskeleton is a known target of zinc binding in the cell, especially in microtubules, and it has been proposed that microtubule dynamics may also be disrupted when cellular zinc levels drop (Hesketh, 1982; Oteiza *et al.*, 1990). However, the specific molecular machinery, if any, implied in the zinc import into astrocytes and other cells requires further studies.

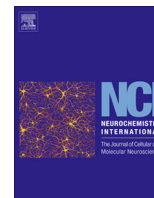
Acknowledgments — We are very grateful to H.L. Warburton for linguistic assistance.

Funding — This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, grant SAF2008-00305), the Addictive Disorders Network (RTA, RETICS, ISCIII, grants RD06/0001/0009). M.P.M and G.E.-P. are recipient fellowships from RTA.

REFERENCES

- Beyersmann D, Haase H. (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* **14**:331–41.
- Bitanhirwe BK, Cunningham MG. (2009) Zinc: the brain's dark horse. *Synapse* **63**:1029–49.
- Bolognin S, Drago D, Messori L *et al.* (2009) Chelation therapy for neurodegenerative diseases. *Med Res Rev* **29**:547–70.
- Canzoniero LM, Sensi SL, Choi DW. (1997) Measurement of intracellular free zinc in living neurons. *Neurobiol Dis* **4**:275–9.
- Carey LC, Coyle P, Philcox JC *et al.* (2000) Maternal ethanol exposure is associated with decreased plasma zinc and increased fetal abnormalities in normal but not metallothionein-null mice. *Alcohol Clin Exp Res* **24**:213–9.
- Carey LC, Coyle P, Philcox JC *et al.* (2003) Zinc supplementation at the time of ethanol exposure ameliorates teratogenicity in mice. *Alcohol Clin Exp Res* **27**:107–10.
- Chen WJ, Berryhill EC, West JR. (2001) Zinc supplementation does not attenuate alcohol-induced cerebellar Purkinje cell loss during the brain growth spurt period. *Alcohol Clin Exp Res* **25**:600–5.
- Chung RS, Penkowa M, Dittmann J *et al.* (2008) Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. *J Biol Chem* **283**:15349–58.
- Colvin RA, Laskowski M, Fontaine CP. (2006) Zinquin identifies subcellular compartmentalization of zinc in cortical neurons. Relation to the trafficking of zinc and the mitochondrial compartment. *Brain Res* **1085**:1–10.
- Cousins RJ. (1994) Metal elements and gene expression. *Annu Rev Nutr* **14**:449–69.
- Dalton TP, Bittel D, Andrews GK. (1997) Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain. *Mol Cell Biol* **17**:2781–9.
- Dineley KE, Scanlon JM, Kress GJ *et al.* (2000) Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased [Zn(2+)](i). *Neurobiol Dis* **7**:310–20.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL *et al.* (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* **22**:998–1040.
- Eide DJ. (2006) Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* **1763**:711–22.
- Florianczyk B. (2000) Zinc level in selected tissues of ethanol and morphine intoxicated mice. *Med Sci Monit* **6**:680–3.
- Flynn A, Miller SI, Martier SS *et al.* (1981) Zinc status of pregnant alcoholic women: a determinant of fetal outcome. *Lancet* **1**:572–575.
- Frederickson CJ, Danscher G. (1990) Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Prog Brain Res* **83**:71–84.
- Frederickson CJ, Hernandez MD, McGinty JF. (1989) Translocation of zinc may contribute to seizure-induced death of neurons. *Brain Res* **480**:317–21.
- Frederickson CJ, Rampy BA, Reamy-Rampy S *et al.* (1992) Distribution of histochemically reactive zinc in the forebrain of the rat. *J Chem Neuroanat* **5**:521–30.
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI. (2005) The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **6**:449–62.
- Geer KR, Zhou ZL, Ton-That D *et al.* (2002) Measuring zinc in living cells. A new generation of sensitive and selective fluorescent probes. *Cell Calcium* **31**:245–51.
- Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC. (2005) Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Bio Med (Maywood)* **230**:394–406.
- Guerri C, Renau-Piqueras J. (1997) Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol Neurobiol* **15**:65–81.
- Guerri C, Pascual M, Renau-Piqueras J. (2001) Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* **22**:593–9.
- Guerri C, Bazinet A, Riley EP. (2009) Foetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol* **44**:108–14.
- Hesketh JE. (1982) Zinc-stimulated microtubule assembly and evidence for zinc binding to tubulin. *Int J Biochem* **14**:983–90.
- Heuser JE, Anderson RG. (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108**:389–400.
- Izumi Y, Auberson YP, Zorumski CF. (2006) Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *J Neurosci* **26**:7181–8.
- Kim YH, Kim EY, Gwag BJ *et al.* (1999) Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* **89**:175–82.
- Kim J, Kim TY, Hwang JJ *et al.* (2009) Accumulation of labile zinc in neurons and astrocytes in the spinal cords of G93A SOD-1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* **34**:221–9.
- Lu B, Yokoyama M, Dreyfus CF *et al.* (1991) NGF gene expression in actively growing brain glia. *J Neurosci* **11**:318–26.
- Marín MP, Tomás M, Esteban-Pretel G *et al.* (2008) Chronic ethanol exposure induces alterations in the nucleocytoplasmic transport in growing astrocytes. *J Neurochem* **106**:1914–28.
- Marín MP, Esteban-Pretel G, Ponsoda X *et al.* (2010) Endocytosis in cultured neurons is altered by chronic alcohol exposure. *Toxicol Sci* **115**:202–13.
- Martínez SE, Egea G. (2007) Novel molecular targets for the prevention of fetal alcohol syndrome. *Recent Pat CNS Drug Discov* **2**:23–35.
- Megías L, Guerri C, Fornas E *et al.* (2000) Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. *Int J Dev Biol* **44**:209–21.

- Miñana R, Sancho-Tello M, Climent E *et al.* (1998) Intracellular location, temporal expression, and polysialylation of neural cell adhesion molecule in astrocytes in primary culture. *Glia* **24**:415–27.
- Murillo-Fuentes ML, Artillo R, Ojeda ML *et al.* (2010) Different effects on zinc redistribution if ethanol is consumed before or immediately after birth. *J Trace Elem Med Biol* **24**:200–6.
- Oteiza PI, Cuellar S, Lonnerdal B *et al.* (1990) Influence of maternal dietary zinc intake on in vitro tubulin polymerization in fetal rat brain. *Teratology* **41**:97–104.
- Prasad AS. (1991) Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am J Clin Nutr* **53**:403–12.
- Record IR, Dreosti IE, Tulsi RS *et al.* (1986) Maternal metabolism and teratogenesis in zinc-deficient rats. *Teratology* **33**:311–17.
- Renau-Piqueras J, Zaragoza R, De Paz P *et al.* (1989) Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* **37**:229–40.
- Roberts BR, Tainer JA, Getzoff ED *et al.* (2007) Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. *J Mol Biol* **373**:877–90.
- Sandstead HH, Frederickson CJ, Penland JG. (2000) History of zinc as related to brain function. *J Nutr* **130**:496S–502.
- Sekler I, Sensi SL, Hershfinkel M *et al.* (2007) Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med* **13**:337–43.
- Shah D, Sachdev HP. (2006) Zinc deficiency in pregnancy and fetal outcome. *Nutr Rev* **64**:15–30.
- Sheline CT, Takata T, Ying H *et al.* (2004) Potassium attenuates zinc-induced death of cultured cortical astrocytes. *Glia* **46**:18–27.
- Shuttleworth CW. (2010) Use of NAD(P)H and flavoprotein auto-fluorescence transients to probe neuron and astrocyte responses to synaptic activation. *Neurochem Int* **56**:379–86.
- Smart TG, Hosie AM, Miller PS. (2004) Zn²⁺ ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* **10**:432–42.
- Streissguth AP, O'Malley K. (2000) Neuropsychiatric implications and long-term consequences of fetal alcohol spectrum disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry* **5**:177–90.
- Streissguth AP, Barr HM, Sampson PD *et al.* (1994) Prenatal alcohol and offspring development: the first fourteen years. *Drug Alcohol Depend* **36**:89–99.
- Summers BL, Rofe AM, Coyle P. (2009) Dietary zinc supplementation throughout pregnancy protects against fetal dysmorphology and improves postnatal survival after prenatal ethanol exposure in mice. *Alcohol Clin Exp Res* **33**:591–600.
- Szerdahelyi P, Kasa P. (1987) Partial depletion and altered distribution of synaptic zinc in the rat hippocampus after treatment with sodium diethyldithiocarbamate. *Brain Res* **422**:287–94.
- Takeda A, Minami A, Seki Y *et al.* (2004) Differential effects of zinc on glutamatergic and GABAergic neurotransmitter systems in the hippocampus. *J Neurosci Res* **75**:225–9.
- Todd WR, Elvehjem CA, Hart EB. (1934) Zinc in the nutrition of the rat. *Am J Physiol* **107**:146–56.
- Tomás M, Fornas E, Megías L *et al.* (2002) Ethanol impairs monosaccharide uptake and glycosylation in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* **83**:601–12.
- Tomás M, Durán JM, Lázaro-Diéguez F *et al.* (2004) Fluorescent analogues of plasma membrane sphingolipids are sorted to different intracellular compartments in astrocytes; Harmful effects of chronic ethanol exposure on sphingolipid trafficking and metabolism. *FEBS Lett* **563**:59–65.
- Tomás M, Marín P, Megías L *et al.* (2005) Ethanol perturbs the secretory pathway in astrocytes. *Neurobiol Dis* **20**:773–84.
- Tuerk MJ, Fazel N. (2009) Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* **25**:136–43.
- Vallee BL, Falchuk KH. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* **73**:79–118.
- Valles S, Lindo L, Montoliu C *et al.* (1994) Prenatal exposure to ethanol induces changes in the nerve growth factor and its receptor in proliferating astrocytes in primary culture. *Brain Res* **656**:281–6.
- Varea E, Alonso-Llosa G, Molowny A *et al.* (2006) Capture of extracellular zinc ions by astrocytes. *Glia* **54**:304–15.
- Wellenreuther G, Cianci M, Tucoulou R *et al.* (2009) The ligand environment of zinc stored in vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **380**:198–203.
- Zatta P, Drago D, Bolognini S *et al.* (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol Sci* **30**:346–55.



Astrocytes of the murine model for Down Syndrome Ts65Dn display reduced intracellular ionic zinc



Raúl Ballestín^a, José Miguel Blasco-Ibáñez^a, Carlos Crespo^a, Juan Nacher^a, Rosa López-Hidalgo^a, Javier Gilabert-Juan^{a,b}, Dolores Moltó^b, Emilio Varea^{a,*}

^aNeurobiology Unit and Program in Basic and Applied Neurosciences, Cell Biology Department, Universitat de València, Spain

^bGenetics Department, Universitat de València, INCLIVA, CIBERSAM, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2014

Received in revised form 23 May 2014

Accepted 29 May 2014

Available online 6 June 2014

Keywords:

Zinc

Ts65Dn

Down Syndrome

Metallothionein 3

Astrocyte

TSQ

ABSTRACT

Zinc is an essential trace element that is critical for a large number of structural proteins, enzymatic processes and transcription factors. In the brain, zinc ions are involved in synaptic transmission. The homeostasis of zinc is crucial for cell survival and function, and cells have developed a wide variety of systems to control zinc concentration. Alterations in free zinc concentration have been related with brain dysfunction. Down Syndrome individuals present alterations in free zinc concentration and in some of the proteins related with zinc homeostasis. We have analyzed the amount of free zinc and the zinc chelating protein metallothionein 3 in the astrocytes using primary cultures of the murine model Ts65Dn. We have observed a higher number of zinc positive spots in the cytoplasm of trisomic astrocytes but a decrease in the total concentration of total intracellular free zinc concentration (including the spots) respect to control astrocytes. Using FM1–43 staining, we found that the endocytic function remains unaltered. Therefore, a possible explanation for this lower concentration of free zinc could be the higher concentration of metallothionein 3 present in the cytoplasm of trisomic astrocytes. The blockade of metallothionein 3 expression using an specific siRNA induced an increase in the concentration of free zinc in basal conditions but failed to increase the uptake of zinc after incubation with zinc ions.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Zinc is an essential trace element that is critical for a large number of structural proteins, enzymatic processes and transcription factors. The functions of zinc and the effects of its deficiency in the brain and other organs have been continuously studied (Bitanhirwe and Cunningham, 2009). Zinc deficiency affects mainly to proliferative tissues (Hurley, 1981). In adults, the effects of zinc deficiency are more diffuse, affecting the skin, hair, immune function, sexual maturation or neurological function (Tuerk and Fazel, 2009).

In the brain, an excess of zinc ions in the extracellular space induces cell death in cortical neurons (Kim et al., 1999), whereas the experimental chelation of zinc ions may trigger apoptosis (Zalewski et al., 1993). Therefore, a homeostatic balance in the extra/intracellular concentration of zinc ions appear to be necessary. Most cells have developed complex systems to regulate influx

and efflux of cytoplasmic zinc: (a) Metallothioneins, among other proteins, are engaged in the intracellular traffic of zinc. They are small, cystein enriched proteins that are able to bind up to seven zinc ions per molecule (Ebadi et al., 1995). (b) Membrane ZIP (Zrt- and Irt-like proteins) transporters carry zinc ions into the cytoplasm (Guerinot, 2000), and (c) Zinc Transporters (ZnT) carry zinc ions either out of the cytoplasm to the extracellular medium (ZnT1) (Palmiter and Findley, 1995) or into different organelles (ZnT2–9) (Lichten and Cousins, 2009); all these systems collectively maintain the intracellular concentration of free zinc within narrow limits.

Despite the broad distribution of zinc in biological systems, only the ionic fraction may be detected by histochemical techniques. In the central nervous system (CNS), some neurons accumulate zinc ions inside synaptic vesicles (Frederickson and Danscher, 1990), as 'synaptic zinc' which is co-released with glutamate during synaptic transmission. In the extracellular space, zinc ions modulate different types of receptors, including the AMPA/kainate receptor, NMDA and GABA receptors as well as voltage-gated ion channels (Izumi et al., 2006; Smart et al., 2004). Nervous tissue should maintain extracellular zinc levels within limits and astrocytes play an important role in the maintenance of the zinc homeostasis in the

* Corresponding author. Address: Neurobiology Unit, Cell Biology Department, Universitat de València, Dr. Moliner, 50, Burjassot 46100, Spain. Tel.: +34 96 354 3783.

E-mail address: emilio.varea@uv.es (E. Varea).

CNS. This role is developed by these cells mainly due to their lower sensitivity to a toxic zinc insult compared with neurons (Dineley et al., 2000), their capacity to uptake extracellular zinc (Varea et al., 2006), and their capacity to chelate extracellular zinc by releasing metallothionein (Chung et al., 2008).

Down Syndrome (DS) with an incidence of one in 800 live births (Roizen and Patterson, 2003) is the most common genetic alteration typically associated to intellectual disability. Trisomy of the 21 chromosome induces a variable phenotype that may include immune deficiencies, heart defects, increased risk of leukaemia, and an early development of Alzheimer's disease. The common feature among all DS subjects is the presence of mild to moderate mental retardation. Neural mechanisms underlying this disability may include defects in the establishment of neuronal networks, information processing and brain plasticity.

Several animal models are available to mimic the alterations in DS. The most used is the Ts65Dn mouse. This model is segmentally trisomic for a portion of the mouse chromosome 16 that is orthologous to the long arm of the human chromosome 21. This segment contains approximately 140 genes, many of which are highly conserved between mice and humans (Gardiner et al., 2003). These mice display delay in the acquisition of a number of sensory and motor tasks (Costa et al., 1999; Holtzman et al., 1996), as well as defects in learning and in the execution of memory tasks mediated by the hippocampus (Escorihuela et al., 1998; Holtzman et al., 1996; Reeves et al., 1995), and deficits in long-term potentiation (LTP) (Kleschevnikov et al., 2004).

Zinc metabolism is altered in DS and it has been observed a reduction in the presence of zinc in plasma in children (Lima et al., 2010) and adolescents with DS (Marques et al., 2007). Zinc is a micronutrient required by several cellular processes related to growth and differentiation, transcription, and apoptosis. Therefore, maintenance of intracellular zinc homeostasis is crucial for cell survival and functioning.

Extracellular zinc ions may be captured by cells and confined into vesicles, that have been named 'zincosomes' (Beyersmann and Haase, 2001). Zincosomes have been detected in many cell types (Eide, 2006). Although their nature is still unclear, in mammalian astrocytes, they appear to correlate with endocytic activity (Varea et al., 2006). Therefore, the analysis of those factors that might modulate or alter their functions is of great interest. In fact astrocytes seem to be a target of DS. DS fetuses display a higher density of astrocytes. This excess can be related to the developmental abnormalities present in DS patients (Zdaniuk et al., 2011).

Our aim is to analyze the distribution of zinc in Ts65Dn astrocytes in basal conditions and their ability to uptake extracellular zinc ions in relation with the endocytic activity. We have also checked the cytosolic distribution of metallothionein 3 (MT-3) in order to correlate the changes observed in the cytoplasmic zinc concentration with alterations in the concentration of this metallothionein.

2. Material and methods

2.1. Animals

Experimental mice were generated by repeated backcrossing of Ts65Dn females to C57/6Ei 9 C3H/HeSnJ (B6EiC3) F1 hybrid males. The parental generation was obtained from the research colony of Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA). Euploid littermates of Ts65Dn mice served as controls. For this study we have used newborn mice. Cells from each different animal were grown in separate dish plates. The genotypic characterization was established by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) from genomic DNA extracted of mice tails by mean of the phenol–chloroform method. The genes

analyzed were APP (3 copies) and Apo-B (2 copies) as previously used (Liu et al., 2003). The relative amount of each gene was quantified by the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). All animal experimentation was conducted in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes and was approved by the Committee on Bioethics of the Universitat de València. Every effort was made to minimize the number of animals used and their suffering.

2.2. Primary astrocyte culture

Primary cell cultures of astrocytes were obtained from newborn mice. Animals were decapitated under deep anesthesia (chloral hydrate 4% 1 ml/100 g), and brains were carefully removed and mechanically disaggregated in a Ca²⁺ deficient solution (Hanks balanced salt solution, without Ca²⁺ and Mg²⁺, supplemented with 1 mM sodium pyruvate and 10 mM HEPES) until cell suspension was reached. The Ca²⁺ concentration was then restored by mixing (2:1) with normal solution, the suspension was centrifuged (1 min at 200g) to remove cellular debris and then resuspended in Dulbecco's Minimum Essential Medium, supplemented with antibiotics (penicillin and streptomycin), 2 mM L-glutamine and 5% fetal bovine serum (FBS), and finally cultured in Petri dishes. After reaching confluence, cells were subdivided 1:6 and used for zinc imaging experiments 3–5 days after passage. Under these conditions, cell culture is enriched in astrocytes (at least 95%).

2.3. Transfection procedure

The primary astrocytic cell culture was prepared as described above using a six wells tissue culture plate. Three wells containing coverslips were seeded with the astrocytic culture. Cells grew up to a 70% confluency in a normal growth medium supplemented with 5% FBS. The first well was transfected with a control plasmid (sc-108065, Santa Cruz Biotechnology), the second was transfected with a plasmid containing shMT-3 (sc-934338-SH, Santa Cruz Biotechnology) and the third was maintained in control conditions. The following solutions were prepared freshly:

Solution A, Plasmid DNA Solution: For each transfection, a dilution of 10 µl of resuspended shRNA Plasmid DNA (1 µg shRNA Plasmid DNA control or MT-3) into 90 µl shRNA Plasmid Transfection Medium (sc-108062, Santa Cruz Biotechnology).

Solution B, Plasmid Transfection Reagent: For each transfection, a dilution of 4 µl of shRNA Plasmid Transfection Reagent (sc-108061, Santa Cruz Biotechnology) into 96 µl of shRNA Plasmid Transfection Medium.

The shRNA Plasmid DNA solution (Solution A) was directly added to the solution containing the shRNA Plasmid Transfection Reagent (Solution B) using a micropipette. The solution was mixed gently by pipetting up and down and the mixture was incubated for 45 min at room temperature before transfection.

Then, the cells were washed twice with 2 ml of shRNA Plasmid Transfection Medium. After aspirating the medium, 0.8 ml shRNA Plasmid Transfection Medium were added to each well and then 200 µl shRNA Plasmid DNA/shRNA Plasmid Transfection Reagent Complex (Solution A + Solution B) were added dropwise to each well, covering the entire surface. Afterwards, the medium was mixed it up gently by swirling the plate to ensure that the entire cell layer was immersed in a homogeneous solution. The cells were incubated for 7 h at 37 °C in a CO₂ incubator. Following incubation, 1 ml of normal growth medium containing two times normal serum and antibiotic concentration (2× normal growth medium) were added to the medium and the cells were incubated in this medium for 24 h.

The transfected cells were selected using puromycin, since the plasmid provides resistance to this antibiotic. The selecting medium was composed of 1 µg/ml of puromycin in normal growth medium. The cells were maintained in this medium for 4 days (replacing it with fresh medium after two days). Then, the cells were submitted to zinc imaging in basal and stimulated conditions. An additional cover glass was used to test the effect of the treatment on the expression of MT-3.

2.4. Ionic zinc staining with TSQ

Visualization of total/intracellular ionic-free zinc in living cells was carried out using the zinc-fluorochrome N-6-methoxy-p-toluenesulfonimide quinoline (TSQ) (Molecular Probes). All incubations and treatments were performed in oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (in mM NaCl 126, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1.3, CaCl₂ 2.4, Glucose 11 and NaHCO₃ 25, with a pH of 7.3 when gassed with 95% O₂ and 5% CO₂). Cells were incubated with 50 µg/ml TSQ in fresh oxygenated ACSF for 10 min. The cells were then washed with fresh-oxygenated ACSF and visualized using a fluorescence microscope (excitation wavelength 380 nm, emission wavelength 480 nm).

2.5. Zinc loading

To test the capacity of zinc loading astrocytes were incubated in presence of 50 µM ZnSO₄ in oxygenated ACSF during 10 min. After washing, cells were incubated with 50 µg/ml TSQ in fresh oxygenated ACSF for 10 min. The cells were then washed with fresh-oxygenated ACSF and visualized using a fluorescence microscope as before.

2.6. Endosomes staining with FM1–43

For endosome imaging, cells were simultaneously incubated with 10 µM ZnSO₄ and 10 µM FM1–43 (a membrane marker used to quantify endocytosis, Molecular Probes) in fresh-oxygenated ACSF for 10 min and observed at a 510 nm excitation wavelength, 626 nm emission wavelength. Double labelling for zinc was achieved by subsequent incubation in 50 µg/ml TSQ in fresh-oxygenated ACSF for 10 min as described earlier.

2.7. MT-3 immunofluorescence

Cover glasses with attached astrocytes were processed for immunocytochemistry as follows. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB during 20 min. After washing, cells were incubated for 1 h with 5% normal donkey serum (NDS) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) in PBS with 0.2% Triton-X100 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA), incubated for 2 h at room temperature in polyclonal rabbit anti-MT-3 antibody (1:1000; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and then in donkey anti-rabbit IgG, conjugated with Alexa 555 for 2 h (1:200; Molecular Probes). After washing, the cover glasses were mounted using fluorescence mounting medium (Dako Cytomation).

This antibody has been previously tested in its laboratory of origin. In order to confirm that some of the immunostaining was not produced by the secondary antibody or by the immunocytochemical protocol, we omitted the primary antibody and substituted it by normal donkey serum. Controls resulted in a complete absence of immunostaining in every case.

2.8. Image capture, processing and analysis

Fluorescence images were captured using a very sensible high speed camera (Hamamatsu ORCA C7780) attached to a fluorescence

microscope (Olympus BX50WI) with Uniblitz shutter driver and Sutter Lambda 10–2 wheel filter controlled by a computer with the Aquacosmos software (Hamamatsu Photonics K.K.). Fluorescence intensity was measured using Image J software (NIH) and results were expressed as percentage of the control in basal conditions. For zincosomes quantifications, we have counted the number of spots per cell in random images at a high magnification (60×).

Statistical analysis was performed using SPSS v14.0 software (SPSS, Chicago, IL). At least fifty cells were averaged for comparison between the different groups.

3. Results

We have quantified the fluorescence emission of TSQ, a reliable marker for zinc ions, in primary astrocyte culture from newborn Ts65Dn mice using their euploid littermates as control in basal conditions and after zinc incubation (50 µM, 10 min) (Fig. 1).

In basal conditions there was a reduction of 20% ($p < 0.001$) in the fluorescence emission of TSQ in Ts65Dn cells respect to control cells, reflecting a similar reduction in the concentration of free zinc (Fig. 1E). Attending to the presence of positive spots of zinc presents in the cytoplasm (Fig. 1F), commonly called “zincosomes” (Beyersmann and Haase, 2001), we have observed that in control conditions zincosomes are absent in normosomic astrocytes whereas are common in trisomic ones (0.15 ± 0.06 zincosomes per cell in control vs 2.32 ± 0.58 zincosomes per cell in trisomic astrocytes; $p < 0.05$).

Next we analyzed the ability of astrocytes to uptake extracellular zinc ions and to manage the uptake of zinc. We incubated the primary cell cultures with 50 µM ZnSO₄ during 10 min and observed that both control and trisomic astrocytes were able to trap zinc ions from the extracellular medium. In control astrocytes there was an increase of 18% in the total intracellular concentration of zinc, whereas in trisomic mice the increase was only of 13%. These increments were statistically significant in both cases ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) (Fig. 1E). Differences between the concentration of zinc after loading in both control and trisomic remained also significant ($p < 0.001$). A global analysis of the results showed that either the phenotype or the incubation with zinc induces differences in the intracellular amount of zinc in the astrocytes (for phenotype $p < 0.0001$; for zinc stimulation $p < 0.001$).

We have analyzed the changes in the presence of zincosomes after the incubation with extracellular zinc. We have observed that the incubation with zinc induced a dramatic increase in the number of zincosomes per cell in both control and trisomic astrocytes (from 0.15 to 8.5 for control and from 2.32 to 11.24 in trisomic astrocytes). The increases observed in both types of astrocytes were statistically significant. Again, the global analysis of the data for zincosomes revealed that there were differences for phenotype and zinc incubation ($p < 0.05$ for phenotype and $p < 0.001$ for zinc incubation). However, after zinc incubation the number of zincosomes per cell was similar in both control and trisomic astrocytes (respectively 8.50 ± 2.42 vs 11.24 ± 1.86 zincosomes per cell; $p = 0.3634$).

Previous studies from others and from our laboratory have shown that the uptake of zinc ions may follow a endocytic process mediated by clathrin (Varea et al., 2006). Then, we have analyzed the endocytic function in trisomic and control astrocytes using FM1–43 loading (Fig. 2A) and analyzed the relative emission of fluorescence respect to the basal level observed after incubation in controls (100%). We have observed that both groups of astrocytes were able to uptake a similar amount of FM1–43 in ten minutes of loading and were able to metabolize it similarly, as indicated by the fluorescence emission decrease after 10 min

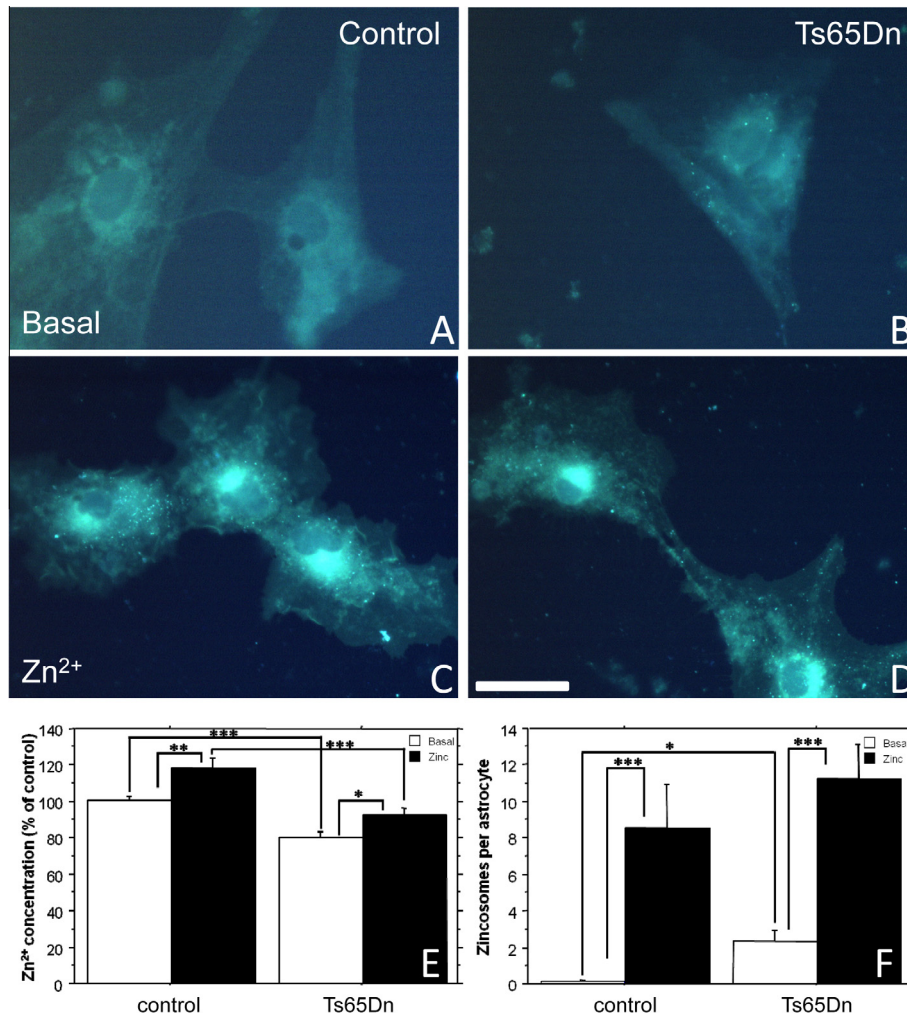


Fig. 1. Distribution and uptake of zinc in Ts65Dn astrocytes. Representative images of astrocytes loaded with TSQ from control (A and C) and Ts65Dn (B and D) mice under basal conditions (A and B) or after zinc loading (C and D). Observe the presence of zincosomes in the trisomic astrocytes under basal conditions. (E) Graph representing the amount of zinc (measured by fluorescence emission after TSQ loading) in basal conditions (white bars) or after zinc loading (black bars) in control and Ts65Dn astrocytes. (F) The same than E but for zincosomes per cell (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Scale bar: 10 microns.

in normal medium (100 ± 8.14 vs 87.59 ± 5.27 control vs trisomic $p = 0.119$). After 10 extra minutes of incubation in absence of the tracer, we have observed that in both groups the fluorescence emission due to FM1–43 was decreased by a similar quantity (58.26 ± 2.92 vs 54.32 ± 4.21 ; $p = 0.6086$). The integrative analysis of the data revealed that there was an effect from the time after FM1–43 loading but not from the phenotype, so we can conclude that, in the astrocytes of Ts65Dn mice, the general endocytic function remains unaltered.

Finally, we have analyzed the expression of the MT-3 (Fig. 2B) in astrocytes since its overexpression has been characterized previously in other cell types in DS (Arai et al., 1997). We have observed an overexpression of MT-3 in the cytoplasm of trisomic astrocytes (100 ± 4.01 vs 119.22 ± 4.67 $p < 0.01$).

Next we tested whether the reduction of MT-3 expression could lead to an increase in the concentration of zinc ions in the cytoplasm of astrocytes using siRNA for the MT-3 gene (Fig. 3). We have observed that the reduction of MT-3 expression (around 15% of normal levels) (Fig. 3E) induces an increase in the concentration of cytosolic zinc (40% approximately) in both control and trisomic astrocytes (Fig. 3D). However, under the zinc uptake conditions, no increase of this metal was observed in astrocytes in which MT-3 expression was reduced (Fig. 3D).

4. Discussion

In this study, we have observed an alteration in the basal distribution of zinc in the astrocytes from trisomic mice. We found a higher number of zinc positive spots in the cytoplasm of trisomic astrocytes but a decrease in the total concentration of total intracellular free zinc (including the spots). Since the endocytic function remains unaltered, as previously shown in other cell types of DS models (Cataldo et al., 2003), a possible explanation for this lower concentration of free zinc could be the excess of MT-3 (a zinc chelating protein) present in the cytoplasm of trisomic astrocytes. This possibility has been confirmed by blocking the expression of MT-3 using an specific siRNA. This treatment reduces the expression of MT-3 and induces an increase in the concentration of cytosolic zinc in the astrocytes. These observations agree with the results observed in DS individuals (Arai et al., 1997).

The intracellular distribution of zinc observed in the astrocytes of both control and trisomic mice agrees with previous studies (Varea et al., 2006), with a diffuse staining in the cytoplasm and the presence of hot spots in the cytoplasm, namely “zincosomes” (Beyersmann and Haase, 2001). The fluorophore used, TSQ, has the ability to traverse membranes and binds to ionic zinc (Frederickson et al., 1987). Using it in physiological medium shows

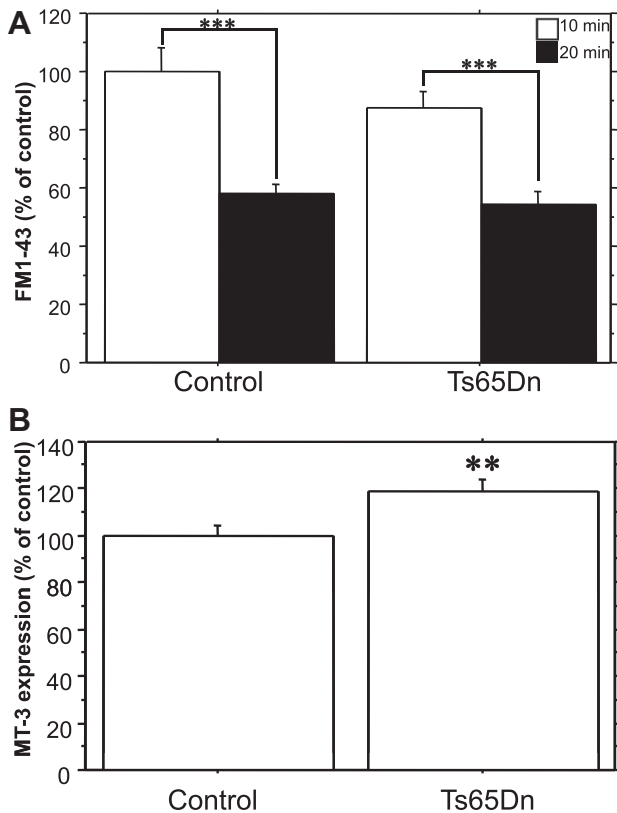


Fig. 2. Endocytic function and MT-3 expression in Ts65Dn astrocytes. (A) Graph showing the fluorescence emission due to the marker FM1-43 after loading (10 min, white bars) or after processed (20 min, black bars). (B) Graph showing the expression of MT-3 in the cytoplasm of astrocytes from control and Ts65Dn astrocytes. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

the distribution of ionic zinc, both cytosolic and intraorganellar, in live cells (Varea et al., 2001).

In basal conditions there is a reduction in the cytosolic concentration of ionic zinc of around 20% in astrocytes of trisomic mice.

Low levels of zinc have been related to different abnormalities, both physiological and developmental (Sandstead, 2000), in some cases related with mental capacities. Our results reflect a reduction in the basal level of intracellular zinc in astrocytes. Accordingly, since astrocytes control the CNS barriers, it seems reasonable to propose that zinc entry and bioavailability to neurons would be impaired in trisomic mice compared with their control littermates. Previous studies have demonstrated an alteration in zinc metabolism in DS. A reduction in the presence of zinc in DS has been detected in the plasma of children (Lima et al., 2010) and adolescent (Marques et al., 2007) as well as in the hair (Yenigun et al., 2004).

On the other hand, the higher presence of zincosomes in the cytoplasm of astrocytes coming from Ts65Dn pups could reflect also an impairment in the traffic of trapped zinc ions. Trisomic mice astrocytes may have problems to metabolize captured ionic zinc. The presence of zincosomes in non-stimulated astrocytes may reflect an impaired or slower processing of the captured ionic zinc.

In agreement with other studies using different cell types of DS models (Cataldo et al., 2003), we found that the endocytic function of trisomic astrocytes remains unaltered. Therefore other mechanism may be responsible of the lower free zinc concentration in the trisomic astrocytes respect to the control cells. Because metallothioneins have the ability to trap zinc ions reducing the concentration of free zinc (Malaiyandi et al., 2004; Paski et al., 2003) and MT-3, a member of metallothionein family, has been found overexpressed in other cell types in DS (Arai et al., 1997), we suggested that this protein may be in excess in the Ts65Dn astrocytes. We found that the MT-3 levels were higher in the cytoplasm of trisomic astrocytes than in the controls and that the knockdown of MT-3 gene reduces the MT-3 protein amount and increases the concentration of cytosolic zinc in the astrocytes. Therefore, an excess of MT-3, could explain, at least in part, the reduction of free zinc observed in Ts65Dn astrocytes. Moreover, MT-3 was initially characterized by its inhibitor action over neurite extension and was named “neuronal growth inhibitory factor” (Palmiter et al., 1992). The excess of MT-3 could be related with the dendritic atrophy observed in neurons from individuals and murine models of DS in many brain regions.

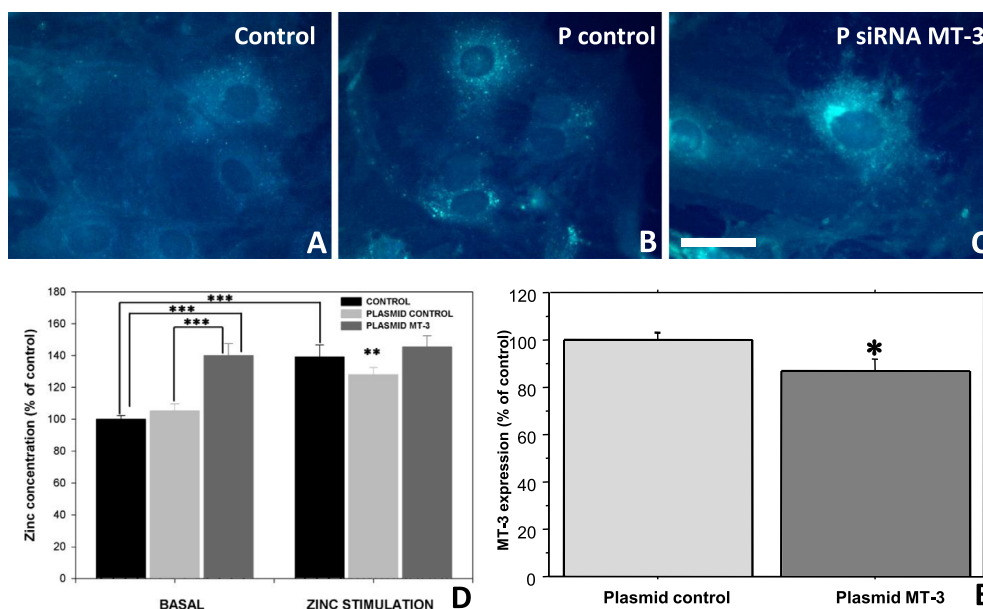


Fig. 3. Effect of silencing RNA for MT-3 in Ts65Dn astrocytes. (A–C) Representative images of astrocytes loaded with TSQ from control (A), transfected with control plasmid (B) and transfected with the siRNA for MT-3 cultures (C). (D) Graph representing the amount of zinc (measured by fluorescence emission after TSQ loading) in basal conditions or after zinc loading in the three groups analyzed. (E) Graph showing the expression of MT-3 in the cytoplasm of astrocytes transfected with control plasmid or plasmid containing siRNA for MT-3. Note: ** over fifth column represents significance between the second and the fifth column (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Scale bar: 10 microns.

The homeostasis of calcium, another divalent cation that share many ionic channels with zinc, have been previously studied in astrocytes from Ts65Dn mice (Bambrick et al., 2003) showing a level of resting cytosolic calcium higher than control. Similar results were obtained in the Ts16 model (Bambrick et al., 1997). Dysregulation of calcium reflects alterations in both the ionic channels and pumps and the intracellular systems of homeostasis for calcium, most probably ionic zinc levels are also affected by this alteration.

Therefore, zinc homeostasis seems to be affected in Ts65Dn astrocytes. They have a lower concentration under basal conditions and this lower concentration correlates with an excess of MT-3 in the cytoplasm. Our study has characterized alterations in the so-called “histochemically” detectable pool or free zinc. This pool of exchangeable zinc represents about 15% of the total zinc. The rest of zinc is strongly bound to different enzymes and structural proteins. From our present results we cannot determine whether the total amount of zinc could be affected. However, previous studies (Lima et al., 2010; Marques et al., 2007) have found deficits of total zinc in the plasma of individuals with DS. Consequently, we can assume that, most likely, the total zinc concentration is affected in the astrocytes of trisomic mice.

5. Conclusions

Astrocytes from Ts65Dn display a lower concentration of zinc ions than controls, however they present more spots in their cytoplasm (zincosomes). Trisomic astrocytes have similar ability to uptake zinc ions from the extracellular medium than the control astrocytes and their endocytic function remains unaltered. Astrocytes from Ts65Dn show higher concentration of MT-3 than controls and that could explain, at least partially, the lower amount of free zinc present in their cytoplasm in basal conditions.

Acknowledgements

This study has been funded by Foundation Jerome Lejeune, The Spanish Ministry of Science and Innovation BFU2009-12284/BFI and BFU2012-32512, MICINN-PIM2010ERN-00577/NEUCONNECT in the frame of ERA-NET NEURON, Generalitat Valenciana ACOMP/2012/229 and PROMETEO 2013/069.

References

Arai, Y., Uchida, Y., Takashima, S., 1997. Developmental immunohistochemistry of growth inhibitory factor in normal brains and brains of patients with Down syndrome. *Pediatr. Neurol.* 17, 134–138.

Bambrick, L.L., Golovina, V.A., Blaustein, M.P., Yarowsky, P.J., Krueger, B.K., 1997. Abnormal calcium homeostasis in astrocytes from the trisomy 16 mouse. *Glia* 19, 352–358.

Bambrick, L.L., Yarowsky, P.J., Krueger, B.K., 2003. Altered astrocyte calcium homeostasis and proliferation in the Ts65Dn mouse, a model of Down syndrome. *J. Neurosci. Res.* 73, 89–94.

Beyersmann, D., Haase, H., 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biomaterials* 14, 331–341.

Bitanhirwe, B.K.Y., Cunningham, M.G., 2009. Zinc: the brain's dark horse. *Synapse* 63, 1029–1049.

Cataldo, A.M., Petanceska, S., Peterhoff, C.M., Terio, N.B., Epstein, C.J., Villar, A., Carlson, E.J., Staufenbiel, M., Nixon, R.A., 2003. App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *J. Neurosci.* 23, 6788–6792.

Chung, R.S., Penkowa, M., Dittmann, J., King, C.E., Bartlett, C., Asmussen, J.W., Hidalgo, J., Carrasco, J., Leung, Y.K.J., Walker, A.K., Fung, S.J., Dunlop, S.A., Fitzgerald, M., Beazley, L.D., Chuah, M.I., Vickers, J.C., West, A.K., 2008. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. *J. Biol. Chem.* 283, 15349–15358.

Costa, A.C., Walsh, K., Davisson, M.T., 1999. Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol. Behav.* 68, 211–220.

Dineley, K.E., Scanlon, J.M., Kress, G.J., Stout, A.K., Reynolds, I.J., 2000. Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased $[Zn(2+)](i)$. *Neurobiol. Dis.* 7, 310–320.

Ebadi, M., Iversen, P.L., Hao, R., Cerutti, D.R., Rojas, P., Happe, H.K., Murrin, L.C., Pfeiffer, R.F., 1995. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* 27, 1–22.

Eide, D.J., 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 711–722.

Escorihuela, R.M., Vallina, I.F., Martínez-Cué, C., Baamonde, C., Dierssen, M., Tobeña, A., Flórez, J., Fernández-Teruel, A., 1998. Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 247, 171–174.

Frederickson, C.J., Danscher, G., 1990. Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Prog. Brain Res.* 83, 71–84.

Frederickson, C.J., Kasarskis, E.J., Ringo, D., Frederickson, R.E., 1987. A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J. Neurosci. Methods* 20, 91–103.

Gardiner, K., Fortna, A., Bechtel, L., Davisson, M.T., 2003. Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* 318, 137–147.

Guerinot, M.L., 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 190–198.

Holtzman, D.M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D.J., Daniels, S.E., Johnson, R.M., Chen, K., Sun, Y., Carlson, E., Alleve, E., Epstein, C.J., Mobley, W.C., 1996. Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13333–13338.

Hurley, L.S., 1981. Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. *Physiol. Rev.* 61, 249–295.

Izumi, Y., Auberson, Y.P., Zorumski, C.F., 2006. Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *J. Neurosci.* 26, 7181–7188.

Kim, Y.H., Kim, E.Y., Gwag, B.J., Sohn, S., Koh, J.Y., 1999. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 89, 175–182.

Kleschevnikov, A.M., Belichenko, P.V., Villar, A.J., Epstein, C.J., Malenka, R.C., Mobley, W.C., 2004. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci.* 24, 8153–8160.

Lichten, L.A., Cousins, R.J., 2009. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiological regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 153–176.

Lima, A.S., Cardoso, B.R., Cozzolino, S.F., 2010. Nutritional status of zinc in children with Down syndrome. *Biol. Trace Elem. Res.* 133, 20–28.

Liu, D.P., Schmidt, C., Billings, T., Davisson, M.T., 2003. Quantitative PCR genotyping assay for the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Biotechniques* 35, 1170–1174, 1176, 1178 passim.

Malaiyandi, L.M., Dineley, K.E., Reynolds, I.J., 2004. Divergent consequences arise from metallothionein overexpression in astrocytes: zinc buffering and oxidant-induced zinc release. *Glia* 45, 346–353.

Marques, R.C., de Sousa, A.F., do Monte, S.J.H., Oliveira, F.E., do Nascimento Nogueira, N., Marreiro, D., do N., 2007. Zinc nutritional status in adolescents with Down syndrome. *Biol. Trace Elem. Res.* 120, 11–18.

Palmiter, R.D., Findley, S.D., 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J.* 14, 639–649.

Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E., Durnam, D.M., 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6333–6337.

Paski, S.C., Covery, L., Kummer, A., Xu, Z., 2003. Role of metallothionein in regulating the abundance of histochemically reactive zinc in rat tissues. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81, 815–824.

Reeves, R.H., Irving, N.G., Moran, T.H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S.S., Schmidt, C., Bronson, R.T., Davisson, M.T., 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* 11, 177–184.

Roizen, N.J., Patterson, D., 2003. Down's syndrome. *Lancet* 361, 1281–1289.

Sandstead, H.H., 2000. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J. Nutr.* 130, 347S–349S.

Smart, T.G., Hosie, A.M., Miller, P.S., 2004. Zn^{2+} ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity. *Neuroscientist* 10, 432–442.

Tuerk, M.J., Fazel, N., 2009. Zinc deficiency. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 25, 136–143.

Varea, E., Ponsoda, X., Molowny, A., Danscher, G., Lopez-Garcia, C., 2001. Imaging synaptic zinc release in living nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 110, 57–63.

Varea, E., Alonso-Llosà, G., Molowny, A., Lopez-Garcia, C., Ponsoda, X., 2006. Capture of extracellular zinc ions by astrocytes. *Glia* 54, 304–315.

Yenigun, A., Ozkinay, F., Cogulu, O., Coker, C., Cetiner, N., Ozden, G., Aksu, O., Ozkinay, C., 2004. Hair zinc level in Down syndrome. *Downs Syndr. Res. Pract.* 9, 53–57.

Zalewski, P.D., Forbes, I.J., Betts, W.H., 1993. Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyl)oxy]acetic acid, a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem. J.* 296 (Pt. 2), 403–408.

Zdaniuk, G., Wierzbą-Bobrowicz, T., Szpak, G.M., Stępień, T., 2011. Astroglial disturbances during development of the central nervous system in fetuses with Down's syndrome. *Folia Neuropathol.* 49, 109–114.