

LA FUNCIÓ DEL ZINC EN EL SISTEMA NERVIÓS EN CONDICIONS NORMALS I PATOLÒGIQUES

Jeús Pérez i Clausell

Departament de Biologia Cel·lular. Universitat de Barcelona

SUMMARY

Zinc is a trace element that is essential for living organisms. Zinc is present in hundreds of enzymes, in DNA regulatory complexes (zinc-fingers), in protective proteins... In addition, a pool of zinc is associated to secretory granules and also to synaptic vesicles in a group of synaptic boutons that use glutamate as neurotransmitter. These zinc rich boutons are particularly abundant in the forebrain and they arise from neurones in all cortical areas and in the amygdaloid complex. Zinc-rich boutons and neurones participate in cortico-cortical, cortico-striatal, hippocamposeptal and amygdalo-hypothalamic connections, among many others.

Zinc is released from synaptic boutons, interacts with postsynaptic glutamate receptors and modulates them. Indeed, zinc modulates synaptic transmission modifying synaptic facilitation (e.g. long-term potentiation).

Zinc appears to be involved in various pathologies and dysfunction of the nervous system. Zinc deficiencies lead to severe foetal malformations and growth retardation, and mild deficiencies render learning impairments in infants. Zinc may have a protective effect against epilepsy by inhibiting glutamate receptors (NMDA type). On the other hand, sprouting of mossy fibre collaterals after injury yields aberrant zinc-rich circuits, which appear to be the anatomical bases for temporal lobe epilepsy. In addition, zinc appears to be involved in excitotoxicity and may trigger cell death by entering postsynaptic neurones. *In vitro* studies also suggest a relation between zinc and apoptosis (related to caspase regulation) or Alzheimer (promoting the aggregation of β -amyloid). Therefore, zinc concentrations in the brain must be strictly regulated and a number of zinc transporters and sequestering proteins have been described.

Zinc is relevant to a wide variety of functions in the nervous system. Alteration in zinc concentrations by drugs or genetic manipulations may be a tool for basic research but also for therapeutics in connection with the pathologies mentioned above.

RESUM

El zinc és un oligoelement essencial per als éssers vius. Hi ha zinc en centenars d'enzims, en complexos reguladors del DNA (*zinc-fingers*), en proteïnes amb funcions estructurals i protectores... A més, una part d'aquest zinc està associada als grànuls de secreció, i també a les vesícules sinàptiques d'un grup de botons sinàptics que utilitzen el glutamat com a neurotransmissor. Aquests botons rics en zinc són molt nombrosos en el telencèfal, i sorgeixen de neurones de totes les àrees corticals i de l'amígdala. Els botons i les neurones rics en zinc participen en les connexions corticocorticals, cortico-estriatals, hipocamposeptals i amigdalohipotàlmiques, entre moltes d'altres.

El zinc dels botons sinàptics s'allibera en arribar l'impuls nerviós, interacciona amb els receptors postsinàptics del glutamat i els modula. Aquesta modulació de la transmissió sinàptica afecta la plasticitat sinàptica, per exemple, la potenciació a llarg termini.

El zinc apareix associat a diversos trastorns del sistema nerviós. La manca de zinc provoca malformacions fetals greus i retards en el creixement infantil, i una lleu deficiència provoca dificultats en l'aprenentatge infantil. El zinc pot tenir un efecte protector contra l'epilèpsia per la inhibició dels receptors del glutamat (del tipus NMDA). D'altra banda, el creixement anormal de les fibres molsoses després d'una lesió pot ser la causa de l'epilèpsia del lòbul temporal humà. A més, el zinc està involucrat en l'excitotoxicitat i pot iniciar la mort neuronal en penetrar en les neurones postsinàptiques. Els estudis *in vitro* també suggereixen una relació entre el zinc i l'apoptosi (per la regulació de les caspases) o la malaltia d'Alzheimer (amb l'agregació del pèptid beta-amiloide). Per tant, les concentracions de zinc cerebral han d'estar molt ben regulades: s'han descrit diversos transportadors de zinc i proteïnes segrestadores.

El zinc intervé en una gran quantitat de funcions del sistema nerviós. Les alteracions de les concentracions de zinc amb fàrmacs o per manipulació genètica poden ser una eina útil per a la recerca bàsica, però també poden tenir, en un futur, aplicacions terapèutiques.

LA TRANSMISSIÓ DE SENYALS EN EL SISTEMA NERVIÓS

La funció del zinc dins el sistema nerviós està íntimament relacionada amb les propietats de les neurones i dels contactes sinàptics. Per tant, abans de centrar-nos en el zinc, ens pot ser útil un repàs dels trets fonamentals d'aquestes estructures.

Com que es celebra el 150è aniversari del naixement de Santiago Ramón y Cajal, repassarem aquests trets agafant com a fil conductor les seves contribucions encara vigents avui en dia.

NEURONA O RETICLE

A finals del segle XIX es qüestionava si el sistema nerviós estava format per una xarxa contínua de fibres nervioses (teoria reticulista) o per cèl·lules individuals amb prolongacions discretes que establien contactes les unes amb les altres (teoria neuronal). Ramón y Cajal defensava la teoria neuronal. Cajal descrivia els axons (els anomenava «cilindroejes») com a fibres nervioses delicades amb eixamplaments als extrems (botons sinàptics terminals) o al llarg de la fibra (botons «en passant»). Aquests terminals axònics entraven en relació estreta amb els cossos cel·lulars (cistells pericel·lulars), les ramificacions dendrítiques i les minúscules espines dendrítiques descrites per ell. En els seus dibuixos feia interpretacions funcionals i assenyalava amb fletxes la circulació d'informació per l'axó fins a arribar al cos o a les dendrites de la neurona següent. L'observació d'aquests contactes sinàptics formats per un botó axònic i un element postsinàptic separats per una distància de deu a vint milionèsimes de mil·límetre (10-20 nm) no va ser possible fins a la meitat del segle XX amb la introducció de les tècniques de microscòpia electrònica (Gray, 1959).

Com va poder arribar Ramón y Cajal a aquestes conclusions encertades amb cinquanta anys d'anticipació? Gràcies a unes preparacions histològiques de qualitat òptima i unes dots d'observació i interpretació extraordinàries. Cajal va dedicar un gran esforç a introduir millores en els protocols d'impregnació de les cèl·lules i fibres nervioses (Ramón y Cajal, 1889), i era molt acurat en la seva aplicació, la qual cosa li permetia obtenir unes preparacions excel·lents. A açò s'afegia un estudi minuciós de les preparacions i una gran clarividència en les seves anàlisis i interpretacions.

LA SINAPSI QUÍMICA: ELS NEUROTRANSMISSORS

En un contacte sinàptic trobem l'element presinàptic (el botó), un petit espai de separació (la fenedura sinàptica) i l'element postsinàptic (una espina o una tija dendrítica, el cos de la neurona o el segment inicial de l'axó). Les sinapsis poden ser de dos tipus: elèctriques i químiques. Les elèctriques són comparables als nexes o unions amb fenedura (*gap junctions*) que hom troba en altres teixits. Aquestes sinapsis elèctriques permeten l'intercanvi ràpid d'ions i, per tant, l'acoblament elèctric de les cèl·lules. Són més freqüents en els invertebrats i al llarg del desenvolupament del sistema nerviós. En el cas de les sinapsis químiques, el botó sinàptic conté unes peti-

tes vesícules plenes d'unes molècules (els neurotransmissors) que s'alliberen a l'espai o fenedura sinàptica i actuen sobre l'element postsinàptic de la manera següent: el neurotransmissor s'uneix a molècules receptores i provoca l'obertura de canals iònics (figura 1). La circulació d'aquests ions provoca petits corrents excitadors (despolaritza la neurona, és a dir, es redueix la diferència de potencial elèctric a través de la membrana) (figura 1c) o inhibidors (hiperpolaritzen la neurona) (figura 1d). Si la suma de potencials excitadors i inhibidors ultrapassa un llindar, la neurona postsinàptica descarregarà un impuls nerviós robust (un potencial d'acció) (figura 1c).

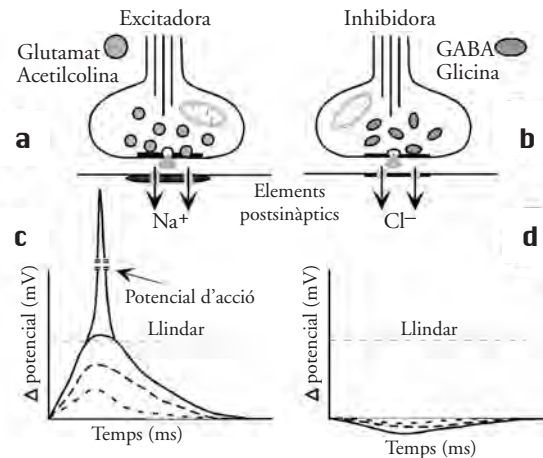


FIGURA 1. Morfologia i fisiologia de les sinapsis químiques. *a*) En una sinapsi excitadora, el botó sinàptic conté vesícules sinàptiques clares i rodones (vegeu també la figura 3). Aquestes alliberen el seu contingut a l'espai sinàptic. El neurotransmissor (glutamat o acetilcolina) s'uneix amb els seus receptors de la membrana de l'element postsinàptic i aquesta unió provoca l'obertura de canals de sodi. *b*) En una sinapsi inhibidora, el botó sinàptic conté vesícules sinàptiques clares, les quals, per un artefacte de la fixació amb aldehids, adopten una forma allargada. El neurotransmissor alliberat a l'espai sinàptic s'uneix als receptors de la membrana postsinàptica i provoca l'obertura de canals de clor. *c*) L'entrada de sodi en la cèl·lula postsinàptica provoca un petit corrent elèctric i una pujada del potencial de membrana (EPSP o *excitatory postsynaptic potential*). La coincidència d'EPSP pot fer que el potencial de membrana pugi fins a un llindar, la qual cosa provoca que la neurona receptora llanci un impuls nerviós pel seu axó (potencial d'acció). *d*) L'entrada de clor en la cèl·lula receptora provoca un corrent elèctric de sentit contrari i una baixada (es fa més negatiu) del potencial de membrana, és a dir, una hiperpolarització (IPSP o *inhibitory postsynaptic potential*).

Els neurotransmissors inhibidors característics són dos aminoàcids: la glicina i l'àcid gamma-aminobutíric. Entre els neurotransmissors excitadors trobem l'acetilcolina o els aminoàcids com l'aspartat o el glutamat. L'acetilcolina és el neuro-

transmissor de les sinapsis neuromusculars dels vertebrats. El glutamat és el neurotransmissor predominant del cervell dels vertebrats.

EL GLUTAMAT: NEUROTRANSMISSOR EXCITADOR

El glutamat és un aminoàcid que té una cadena lateral amb un altre grup àcid. És un component habitual de les proteïnes i intervé en nombrosos processos metabòlics.

El glutamat és el neurotransmissor característic dels circuits d'entrada a l'escorça cerebral (projeccions talamocorticals), dels circuits d'associació corticocortical i de les vies de sortida cortical (cap a l'estriat, el tàlem, el tronc cerebral i la medulla espinal).

El glutamat actua sobre els seus receptors postsinàptics i provoca l'obertura de canals permeables al sodi. Alguns canals també són permeables al calci, i també al zinc. Es reconeixen més de tres tipus de receptors del glutamat: els del tipus NMDA, AMPA i AMPA/kaïnàt. I dins de cada grup hi ha diferències quant a les subunitats que els formen i les propietats fisiològiques que tenen (rapidesa i durada de la resposta, permeabilitat...).

TAULA 1. *Classificació dels receptors sinàptics del glutamat*

	<i>Ionotròpics</i>			<i>Metabotròpics</i>
	<i>NMDA</i>	<i>AMPA/kaïnàt</i>		
		<i>AMPA</i>	<i>kaïnàt</i>	
Subunitats	NR1 NR2A, NR2B	GluR1 a GluR4	GluR5 a GluR7 KA1 i KA2	mGluR1 a mGluR8

Quan un receptor conté un canal iònic (ionòfor) o hi està acoblat, la unió del neurotransmissor amb el receptor provoca l'obertura del canal i un flux ràpid d'ions que té un efecte breu (mil·lisegons). Aleshores, hom parla de *receptors ionotròpics*. En altres casos, els receptors estan acoblats a la producció de segons missatgers (proteïna G, AMP cíclic...), els quals provoquen canvis de llarga durada dins la cèl·lula receptora. Són els *receptors metabotròpics*. Dins dels receptors del glutamat trobem una àmplia varietat de receptors ionotròpics i metabotròpics.

Els receptors del glutamat estan relacionats amb els fenòmens de la plasticitat sinàptica. És a dir, l'activitat freqüent d'una sinapsi pot donar origen a un increment (facilitació) o una disminució (depressió) del seu efecte. Alguns d'aquests canvis tenen una durada breu (mil·lisegons) però d'altres es mantenen uns quants minuts, hores i fins i tot dies. Els receptors de NMDA estan involucrats en els fenòmens de potenciació a llarg termini, una mena de «memòria» dels circuits sinàptics.

Els receptors del glutamat (NMDA i AMPA) també tenen efectes negatius per a les neurones. Intervenien en el fenomen de la mort neuronal per sobreexcitació o excitotoxicitat (Choi, 1988): una descàrrega excessiva d'aquest circuits amb glutamat provoca l'entrada de calci en la neurona postsinàptica, la qual cosa inicia una seqüència de canvis (alteracions als mitocondris, generació de radicals lliures, inflació de la neurona...) que condueix a la mort neuronal (Choi, 1988). L'excitotoxicitat és la causa de mort neuronal en les lesions cerebrals més comunes com ara la isquèmia (patiments fetals del part, obstrucció dels vasos sanguinis en adults...) (Akai i Yanagihara, 1993), convulsions febrils dels infants, epilèpsia (Olney *et al.*, 1983; Dudek i Spitz, 1997; Ben Ari i Cossart, 2000), traumatismes craneoencefàlics (accidents de circulació...) i algunes malalties neurodegeneratives (per exemple, l'esclerosi lateral amiotròfica) (vegeu l'article del doctor Esquerda en aquest mateix llibre).

EL ZINC EN EL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL

EL ZINC: UN OLIGOELEMENT

El zinc és un element metàl·lic amb tonalitats blavoses. La producció mundial d'aquest metall excedeix els set milions de tones anuals. Té usos industrials molt amplis. S'utilitza en la galvanització del ferro per prevenir que es rovelli. També s'utilitza en la fabricació de bateries (piles) i per a l'estabilització del cautxú i plàstics (en forma d'òxid de zinc) (Berg i Shi, 1996; International Zinc Association, 2003). Pot donar problemes de contaminació industrial, però en dóna menys que altres elements com ara el cadmi, el mercuri o el plom.

El zinc és un element essencial per als éssers vius (Berg i Shi, 1996; International Zinc Association, 2003). El cos humà conté al voltant de 2,5 g de zinc. I en necessitem uns 15 mg diaris per mantenir-nos (uns 10 mg en el cas dels infants). Una dieta equilibrada ens proporciona aquesta quantitat amb escreix. Hi ha aliments rics en zinc, per exemple, les carns roges (bovines i ovines), alguns peixos (arengades) i marisc, llavors (gira-sol i altres fruits secs) i formatges. Els llegums, els cereals, els ous i la llet també aporten zinc a la dieta (Berg i Shi, 1996; International Zinc Association, 2003). La manca de zinc va lligada a la desnutrició, a dietes molt pobres en quantitat i varietat. Es dóna en països del tercer món i fins i tot en països en vies de desenvolupament (al Kurdistan o a l'Amèrica andina), i en casos de malnutrició associada a l'alcoholisme i altres drogodependències. De tota manera, també podem trobar dietes lleugerament pobres en zinc en els països desenvolupats, en famílies pobres amb dietes poc variades que consisteixen gairebé de manera exclusiva en hidrats de carboni. Per exemple, als Estats Units, els nens de la meitat de les famílies de renda baixa i un 30 % de la resta de famílies tenen dietes baixes en zinc (inferiors al 70 % de la quantitat recomanada) (International Zinc Association, 2003; Universitat Tufts, 2003).

EL ZINC I LES VESÍCULES SINÀPTIQUES

En els éssers vius el zinc es troba associat a proteïnes amb activitat catalítica (enzims), proteïnes estructurals, factors reguladors del DNA (dits de zinc o *zinc-fingers*), etc. (Cuajungco i Lees, 1997; Frederickson *et al.*, 2000; Frederickson i Bush, 2001). En tots aquest casos el zinc es troba unit fortament a la proteïna. També trobem una petita part del zinc amb unions febles al teixit; aquest zinc pot detectar-se fàcilment amb tècniques de tinció específiques (mètodes histoquímics) (Danscher, 1981, 1982; Frederickson *et al.*, 1987*a*) (figura 2). Aquests mètodes demostren que en el sistema nerviós, hi ha zinc a les vesícules sinàptiques d'alguns botons sinàptics, que anomenem *botons rics en zinc* (Haug, 1967; Friedman i Price, 1984; Pérez-Clausell i Danscher, 1985; Dyck *et al.*, 1993) (figura 3). Aquests botons es troben per tot el cervell i la medulla espinal, però són particularment abundants en el telencefal: en l'escorça cerebral, l'estriat, el complex amigdalí, el septe... (Haug, 1973; Mengual *et al.*, 1995, 2001; Pérez-Clausell, 1996) (figures 2 i 5).



FIGURA 2. Talls transversals de cervell de la rata on es mostra la tinció histoquímica per al zinc (mètode de Timm del sulfur i la plata) i la detecció immunohistoquímica d'un transportador vesicular del glutamat (VGluT1). *a*) El zinc (en realitat, botons sinàptics rics en zinc) es distribueix per tota l'escorça cerebral, inclosos l'hipocamp, l'amígdala i l'estriat. Hi ha poca reacció en el tàlem i hipotàlem. *b*) El transportador del glutamat VGluT1 (Varoqui *et al.*, 2002) està situat a la membrana de les vesícules sinàptiques i per tant ens marca botons sinàptics. La seva distribució és bastant coincident amb la del zinc.

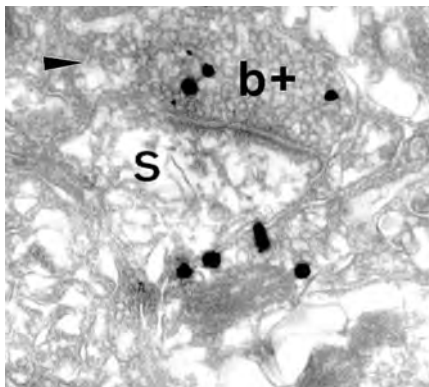


FIGURA 3. Imatge de microscòpia electrònica on s'observa un botó sinàptic ric en zinc (b+) ple de vesícules sinàptiques rodones i clares. Sobre aquestes vesícules observem el marcat esporàdic de grans de plata (negres), que ens indiquen la presència de zinc. El botó b+ fa contacte sinàptic asimètric amb una espina dendrítica (s).

Hi ha mètodes específics que ens permeten trobar les neurones que donen origen a aquests botons sinàptics. Es basen en la injecció *in vivo* de sals de seleni, la precipitació del zinc i el seu transport fins al cos de la neurona (transport o traçat retrògrad) (Slomianka *et al.*, 1990; Howell i Frederickson, 1990) (figura 4). Posteriorment, els precipitats es revelen per una amplificació amb sals de plata (similar a un revelat fotogràfic) (Danscher, 1982). Aquest mètode demostra que hi ha neurones riques en zinc per tot el cervell i la medul·la, però que es concentren sobretot a l'escorça cerebral i el complex amigdalí (Garrett *et al.*, 1992; Casanovas-Aguilar *et al.*, 1995, 1998, 2002; Sørensen *et al.*, 1995; Christensen i Geneser, 1995) (figura 5).

Els circuits nerviosos rics en zinc intervien en les nombroses connexions d'associació entre les àrees de l'escorça cerebral (projeccions corticocorticals) (Garrett *et al.*, 1992; Casanovas-Aguilar *et al.*, 1995, 1998, 2002), entre l'escorça cerebral i l'amígdala i entre els mateixos nuclis de l'amígdala (Pérez-Clausell *et al.*, 1989; Christensen i Geneser, 1995). També intervien en les projeccions descendents des de l'escorça cerebral fins a l'estriat (nuclis caudat i putamen) (Sørensen *et al.*, 1995), en la projecció hipocamposeptal (Sørensen *et al.*, 1993) i en les projeccions descendents des de l'amígdala i l'hipocamp fins a l'hipotàlem (Pérez-Clausell *et al.*, 1989). Recentment s'han trobat també en projeccions ascendents (des de la formació reticular mesencefàlica fins al tàlem) (Mengual *et al.*, 2001) i en circuits de la medul·la espinal (Larson *et al.*, 2000; Jo *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2000).

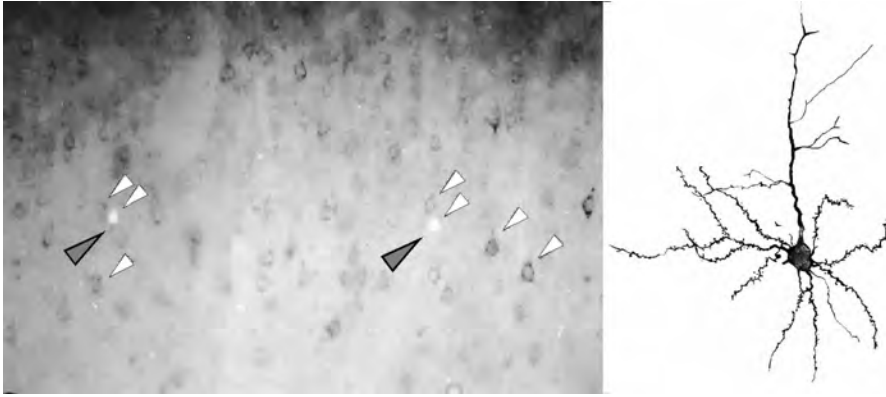


FIGURA 4. Transport retrògrad de precipitats de zinc. La rata va rebre una injecció intracortical de selenit sòdic a fi de precipitar el zinc dels botons sinàptics. Vint-i-quatre hores després de l'operació, els precipitats s'han transportat cap enrere al llarg de l'axó fins a arribar al cos de la neurona (precipitats negres; alguns exemples estan assenyalats amb puntes blanques). Dues d'aquestes neurones van rebre, posteriorment, una injecció intracel·lular d'un marcador fluorescent i biotinitat (el cos de les dues neurones es veu blanc; assenyalat amb dues puntes grises). El marcat intracel·lular es revela posteriorment amb estreptoavidina-peroxidasa, diaminobenzidina i aigua oxigenada. El producte de la reacció ens mostra la morfologia de les neurones riques en zinc (dibuix a càmera clara fet per Neus Miró i Bernié).

Els botons sinàptics rics en zinc els trobem al llarg de tota l'escala evolutiva dels vertebrats: peixos (Piñuela *et al.*, 1992a, 1992b), amfibis, rèptils (López-García *et al.*, 1983; Pérez-Clausell, 1988; Smeets *et al.*, 1989), aus i mamífers (rosegadors, felins, primats..., fins i tot al cervell humà) (Haug, 1973; Sánchez-Andrés *et al.*, 1997; Franco-Pons *et al.*, 2000).

Els circuits rics en zinc estan molt conservats en tots els grups estudiats. Per exemple, la projecció hipocamposeptal es troba tant en rèptils com en mamífers (López-García *et al.*, 1983). I el mateix passa amb la projecció des de l'amígdala fins al nucli ventromedial hipotalàmic, entre altres exemples (Pérez-Clausell, 1988; Pérez-Clausell *et al.*, 1989). Aquesta conservació evolutiva ens suggereix que el zinc pot tenir alguna funció clau en la fisiologia del sistema nerviós.

Els circuits rics en zinc solen coincidir amb circuits que han estat descrits com a circuits glutamatèrgics (que utilitzen el glutamat com a neurotransmissor) (figura 2). A més, els estudis en microscòpia electrònica han permès la localització conjunta de zinc i marcadors del glutamat en els mateixos botons sinàptics (Martínez-Guijarro *et al.*, 1991; Beaulieu *et al.*, 1992; Balet-Sindreu *et al.*, 2003). Malgrat açò, hi ha circuits glutamatèrgics que no donen origen a botons rics en zinc, per exemple, la

projecció de les cèl·lules granulars sobre l'estrat molecular del cerebel (les fibres paral·leles) (Haug, 1973; Danscher, 1981). Per tant, en una primera aproximació podem dir que els circuits rics en zinc són glutamatèrgics, però que hi ha molts circuits glutamatèrgics que *no* tenen zinc. I encara s'hauria de matisar més: ens podem trobar amb circuits rics en zinc que siguin inhibidors (amb glicina o GABA), sobretot en la medul·la espinal (Larson *et al.*, 2000; Jo *et al.*, 2000; Schröder *et al.*, 2000).

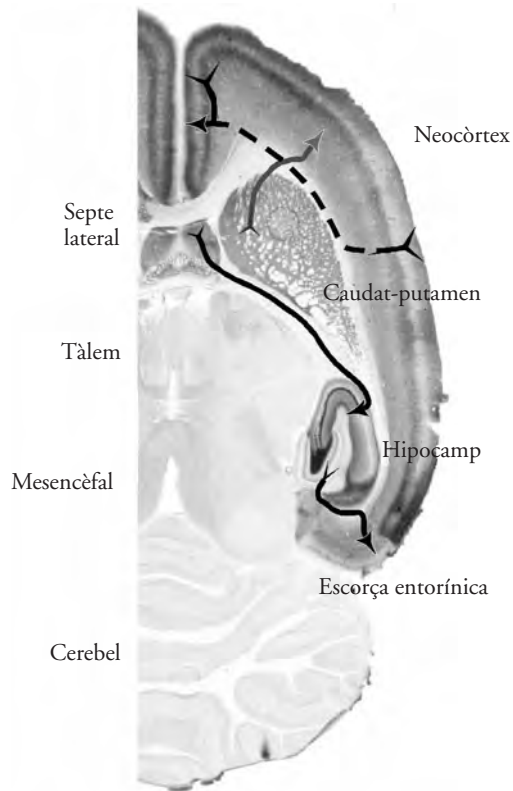


FIGURA 5. Els mètodes d'injecció de seleni ens permeten el traçat dels circuits neuronals rics en zinc. Per exemple, la projecció corticocortical, corticoestriatal, hipocamposeptal i la via perforant des del còrtex entorínic fins al gir dentat. El tàlem, i el cervell mitjà i posterior (mesencèfal, cerebel...) són pobres en circuits en zinc.

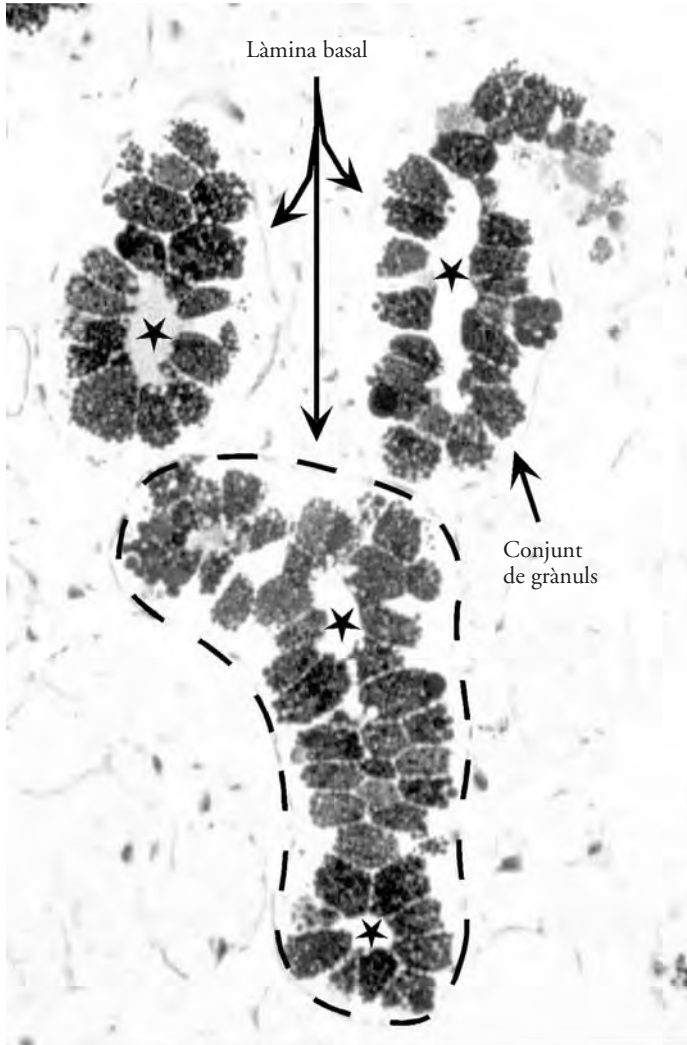


FIGURA 6. Conductes secretors de la glàndula submandibular d'un ratolí mascle on s'observa la presència de zinc en la zona dels grànuls de secreció proteica. De fet, el zinc es localitza a l'interior dels grànuls de secreció, on podria tenir la funció de contribuir a l'empaquetament de les proteïnes dins del grànul (Frederickson *et al.*, 1987*b*; Frederickson i Danscher, 1988). Els quatre símbols amb forma d'estrella indiquen la llum del conducte secretor.

EL ZINC I LA MODULACIÓ DEL GLUTAMAT

L'addició de zinc

Els estudis fisiològics i farmacològics realitzats amb llesques o llonzes de teixit nerviós (experiments *in vitro*), han establert que el zinc (zinc exogen, afegit al medi d'incubació) pot ser un modulador d'una gran quantitat de canals iònics lligats als receptors de glutamat, GABA o glicina, i altres canals no acoblats a receptors (canals de calci sensibles al voltatge...) (Westbrook i Mayer, 1987; Peters *et al.*, 1987; Harrison i Gibbons, 1994; Smart *et al.*, 1994).

Si hom es centra en els receptors del glutamat, observa que l'addició de zinc redueix la resposta dels receptors del glutamat del tipus NMDA i potencia la del tipus AMPA (Westbrook i Mayer, 1987; Peters *et al.*, 1987). Però no tots aquests receptors responen al zinc de manera homogènia. En el primer cas, el zinc s'uneix amb més afinitat a les subunitats NR2A dels receptors NMDA. En el cas dels receptors AMPA, aquests són impermeables al zinc (i al calci) quan contenen la subunitat GluR2.

El zinc endogen

Els experiments anteriors demostren que l'addició de zinc (a vegades en concentracions molt elevades) té efectes sobre la resposta sinàptica. Però, les petites quantitats que es poden alliberar *in vivo*, tenen també aquest efecte? S'ha observat que el segrest del zinc (amb agents quelants extracel·lulars) provoca un augment dels corrents elèctrics en les sinapsis de les fibres molsoses de l'hipocamp de la rata (Vogt *et al.*, 2000). Aquest efecte es produeix a través dels receptors NMDA. Per tant, cal suposar que un dels efectes del zinc sinàptic és la inhibició dels receptors NMDA postsinàptics. De la mateixa manera, en estudis més recents, s'ha observat que el segrest del zinc provoca una major potenciació a llarg termini (LTP) de les sinapsis de l'estrat radiat de la regió CA1 de l'hipocamp. Es a dir, el zinc, en condicions fisiològiques, fa que aquestes sinapsis siguin més resistents a la potenciació (Balet-Sindreu i Jensen, comunicació personal).

EL ZINC EN CONDICIONS PATOLÒGIQUES

La manca de zinc provoca trastorns en el desenvolupament físic i mental

El zinc és un oligoelement essencial per al desenvolupament fetal i postnatal dels individus (Berg i Shi, 1996). Una dieta amb una deficiència important en el

contingut de zinc provoca malformacions fetals greus. La deficiència de zinc en períodes postnats (en infants i adolescents) provoca retards en el creixement, en el desenvolupament del sistema nerviós i dels òrgans sexuals (Fosmire *et al.*, 1975; Hesse, 1979; Cuajungco i Lees, 1997; Sandstead, 2000; Saito *et al.*, 2000; Takeda, 2001). També provoca trastorns del sentit del gust, reducció de l'apetit, i per tant, menor ingestió de menjar, juntament amb pèrdua de pes (International Zinc Association, 2003). Una deficiència lleu en la dieta, molt freqüent fins i tot en països desenvolupats, provoca deficiències en l'aprenentatge i alteracions del comportament, i en conseqüència, un menor rendiment escolar de la població infantil (Penland, 2000). Si s'administren suplementes de zinc per compensar aquestes deficiències, millora aquest rendiment escolar.

El segrest del zinc provoca descàrregues epileptiformes i potencia l'efecte neurotòxic de l'àcid kaínic

Els estudis *in vitro* amb llesques de teixit nerviós (de l'hipocamp) demostren que l'eliminació del zinc mitjançant compostos segrestants (agents quelants) provoca una major activitat neuronal, juntament amb l'aparició de descàrregues epileptiformes (Xu i Mitchell, 1993). Els estudis *in vivo* d'animals tractats amb agents convulsionants (àcid kaínic) ens mostren que la mort neuronal es veu incrementada quan administrem conjuntament agents quelants (Lees *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 2000). L'estudi d'animals amb modificacions genètiques (transgènics) en què s'han eliminat alguns transportadors del zinc, demostren canvis quan tractem aquests animals amb agents convulsionants (Cole *et al.*, 2000). En tots aquests casos, el segrest o l'absència del zinc té efectes negatius, per la qual cosa podem suposar que la presència del zinc pot tenir una funció protectora davant les convulsions, potser a través de la inhibició sobre els receptors del glutamat que abans hem comentat.

En models animals d'epilèpsia del lòbul temporal s'observa un creixement anormal (sprouting) de circuits rics en zinc

L'epilèpsia es una malaltia relativament freqüent (afecta un 0,5 % de la població, és a dir, una de cada dues-centes persones). L'epilèpsia consisteix en alteracions sobtades i recurrents de l'activitat motora (convulsions), sensorial (al·lucinacions) o dels estats de consciència (absències o pèrdues de consciència) provocats per una activitat neuronal excitadora excessiva i reiterada. Més que una malaltia, són un conjunt de símptomes amb causes molt variades.

L'epilèpsia del lòbul temporal humà és un tipus d'epilèpsia on el focus epilèptic es localitza en l'hipocamp (freqüentment en un sol dels hipocamps) i s'estén posteriorment per tot el lòbul temporal (Sloviter, 1994; Dudek i Spitz, 1997; Ben Ari i Cossart, 2000). La causa d'aquesta epilèpsia podria estar en les convulsions febrils de la infantesa, les quals podrien arribar a lesionar algunes neurones sensibles de l'*hilus* del gir dentat (una part de l'hipocamp). Les lesions amb injeccions intraperitoneals d'àcid kaïníc en rates de laboratori reproduïxen amb certa fidelitat les lesions observades en humans (Ben Ari, 1985). En ambdós casos, en rates i en humans, s'observa la mort de neurones en l'*hilus* del gir dentat. Aquestes cèl·lules reben contactes de botons sinàptics rics en zinc que provenen de les cèl·lules granulars del gir dentat. En desaparèixer les neurones receptores de l'*hilus*, els botons sinàptics rics en zinc perden el seu contacte habitual i aleshores els axons creixen buscant un nou lloc de contacte. I ho fan en l'estrat molecular del mateix gir dentat (Cavazos i Sutula, 1990; Sloviter, 1994; Yang *et al.*, 1998). El creixement aberrant d'aquests circuits rics en zinc provocaria que un estat convulsiu ocasional es transformés en crònic.

En casos d'isquèmia o trauma, el zinc s'acumula en neurones en degeneració (podria provocar la mort)

El zinc pot entrar dins les cèl·lules postsinàptiques a través dels canals iònics activats durant la neurotransmissió, per exemple, a través de receptors AMPA/kaïnàt o canals de Ca^{2+} sensibles al voltatge (VSCC o *voltage-sensitive calcium channels*). Aquest és un fenomen normal en la transmissió mitjançant el neurotransmissor glutamat: el glutamat i el zinc s'alliberen des de l'element postsinàptic (Assaf i Chung, 1984; Howell *et al.*, 1984), actuen sobre els receptors postsinàptics i provoquen l'obertura de canals iònics. A més, alguns ions de calci o de zinc (Ca^{2+} i Zn^{2+}) podrien entrar en la cèl·lula postsinàptica, on actuarien com a senyals (segons missatgers) que iniciarien canvis en l'activitat cel·lular.

A banda d'això, en els casos d'isquèmia cerebral, convulsions, lesions traumàtiques o químiques (causades per neurotòxics) es produeix un alliberament excessiu de glutamat que origina una excitació excessiva de la neurona receptora i acaba provocant l'entrada de Ca^{2+} en la cèl·lula receptora i la mort neuronal. Parlem de mort neuronal per excitotoxicitat, com ja s'ha comentat. En aquests casos, també es produirà un alliberament de zinc i l'entrada dins la neurona receptora a través dels canals ja descrits (Choi i Koh, 1998). Els estudis *in vitro* demostren que l'entrada de zinc altera el funcionament mitocondrial i provoca un augment de grups peròxid i altres radicals lliures (ROS o *reactive oxygen species*) i la mort neuronal (Sensi *et al.*, 1999, 2000). El zinc també podria activar algunes molècules reguladores de la via de les caspases que regulen l'apoptosi o mort cel·lular programada (Cuajungco i Lees, 1997).

L'anàlisi microscòpica en casos d'isquèmia, trauma, etc., demostren l'acumulació de zinc a l'interior de cèl·lules en degeneració (Koh *et al.*, 1996; Lees *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2000). Però d'on prové aquest zinc? Si ens fixem en el glutamat, hom sap que el glutamat alliberat prové en part dels botons sinàptics, però la majoria ve de les reserves citoplasmàtiques que són alliberades a l'exterior a causa de la despolarització de les neurones i del funcionament invers dels transportadors del glutamat, que bombegen cap a fora en lloc de fer-ho cap a dins (Rossi *et al.*, 2000). De la mateixa manera, el zinc podria alliberar-se des del botó sinàptic o des del citoplasma cel·lular.

En resum, el zinc s'acumula en neurones en vies de degeneració, però no acaba de quedar clar d'on prové aquest zinc. Tampoc no sabem si l'acumulació de zinc és la causa o la conseqüència de la mort neuronal.

Les concentracions de zinc alterades en la malaltia d'Alzheimer. El zinc promou l'agregació del pèptid beta-amiloide

Un problema semblant el trobem en la relació del zinc amb la malaltia d'Alzheimer. Hi ha concentracions elevades de zinc en mostres de teixit cerebral obtingut d'autòpsies a malalts d'Alzheimer (Cuajungco i Lees, 1997; Danscher *et al.*, 1997). Però és açò una conseqüència o una causa?

En la malaltia d'Alzheimer es pot observar que el citoesquelet de les neurones està alterat i que forma un garbuix de filaments (*fibrillary tangles*). A més, s'observa l'acumulació extracel·lular de proteïnes que dóna lloc a les anomenades *plaques amiloides*, on el pèptid beta-amiloide es troba agregat de manera insoluble. En sistemes *in vitro*, hom ha observat que la presència de zinc afavoreix la precipitació del pèptid beta-amiloide per formar agregats (Mantyh *et al.*, 1993; Bush *et al.*, 1994; Multhaup *et al.*, 1994; Esler *et al.*, 1996; Lovell *et al.*, 1999).

LA REGULACIÓ DEL ZINC

El teixit nerviós té concentracions de zinc que oscil·len al voltant dels 40-70 ppm (40-70 µg de zinc per cada gram de teixit sec, sense el contingut d'aigua) (Frederickson *et al.*, 1982, 1983; Klitenick *et al.*, 1983; Andrasi *et al.*, 1999). A causa del gran nombre de funcions diverses que té el zinc (en enzims, proteïnes reguladores...) aquestes concentracions han d'estar molt controlades. Els experiments amb zinc radioactiu determinen que el zinc cerebral està ben regulat i la velocitat de recanvi és lenta (Tanaka, Jr., 1987; Takeda, 2001).

El control del zinc cerebral dependrà de proteïnes transportadores de les mem-

branes cel·lulars, que en permetran la captació i l'alliberament, i de proteïnes i altres molècules segrestadores, que el podran retenir.

Transportadors

Pel que fa als transportadors de zinc, s'han descrit dues grans famílies basades en els estudis fets en llevats: els transportadors ZIP (*Zrt-, Irt-like Protein*, proteïnes semblants als transportadors Zrt i Irt dels llevats) i els CDR (*Cation Diffusion Facilitator* o facilitadors de la difusió de cations) (Gaither i Eide, 2001). Els primers transporten el zinc cap al compartiment citoplasmàtic (des de l'exterior cel·lular, en el cas de la membrana plasmàtica, o des de la llum dels orgànuls, en el cas de les endomembranes). Els de la família CDR transporten el zinc des del compartiment citoplasmàtic cap a l'exterior cel·lular o l'interior dels orgànuls.

Recentment, s'han descrit en els rosegadors una sèrie de transportadors anomenats ZnT (*zinc transporter*), els quals pertanyen a la família dels transportadors CDR: transporten zinc des del citoplasma cap a l'exterior (ZnT1, ZnT2) (Palmiter *et al.*, 1996*a*) o cap a l'interior de les vesícules sinàptiques (ZnT3) (Palmiter *et al.*, 1996*b*). Alguns d'aquests semblen específics del cervell (ZnT3) però n'hi ha d'altres amb distribucions molt variades (glàndules mamàries, epitelis de revestiment, testicles...) (Rolfs i Hediger, 1999; Colvin *et al.*, 2000; Takeda, 2001).

Metal·lotioneïnes

El zinc tissular no acostuma a estar lliure, sinó que es troba associat a molècules reguladores petites, com pot ser el glutatió, o associat a proteïnes interaccionant amb els residus cisteïna i histidina (Takeda, 2000, 2001). Una part del zinc cerebral està unit a les metal·lotioneïnes. Es tracta de proteïnes amb capacitat d'unir-se a un gran nombre d'àtoms metàl·lics, generalment zinc o coure, però en casos d'intoxicació per metalls es promou la síntesi d'aquestes proteïnes i poden segrestar el cadmi i altres metalls pesats (Aschner, 1996). A banda de la seva capacitat segrestadora de metalls, les metal·lotioneïnes actuen com a proteïnes protectores en resposta a agressions cel·lulars com a conseqüència de lesions, inflamació... (Ebadi *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 1998; Yanagitani *et al.*, 1999). El zinc pot contribuir a la funció positiva d'aquestes metal·lotioneïnes durant el desenvolupament, en la resposta inflamatòria, després de lesions isquèmiques... (Ono *et al.*, 1997; Ono i Cherian, 1998; Penkowa *et al.*, 1999, 2001; Velázquez *et al.*, 1999; Yanagitani *et al.*, 1999).

Cap a on anem?

En 1999 es va crear a Nova York el ZINC o Zinc Information Nutrition Center, en el qual participa la Universitat de Rochefeller i l'Hospital de Nova York (International Zinc Association, 2003). El ZINC té com a objectiu informar els consumidors i els professionals de la salut i l'educació sobre la importància del zinc per a una vida sana, tan important o més que el ferro i moltes vitamines. Tot i que ha estat menysvalorada fins ara, la deficiència de zinc en la dieta apareix com un fenomen freqüent amb importància per al desenvolupament físic i mental dels nens, i també per a l'estat de salut dels adolescents i els adults.

A més d'aquestes funcions generals com a oligoelement necessari (similar a les vitamines), el zinc té unes funcions molt particulars en la regulació de la transmissió nerviosa excitadora. I al mateix temps, el zinc està relacionat amb les lesions neuronals associades als accidents vasculars cerebrals, patiments fetals, convulsions i algunes malalties degeneratives.

Si tenim en compte aquests darrers efectes tan perillosos, és obvi que hem d'avançar en el control del zinc cerebral mitjançant fàrmacs segrestadors (quelants) exclusius del zinc, o inhibidors dels transportadors de zinc de la membrana cel·lular o dels orgànuls. La manipulació de l'expressió gènica d'aquests transportadors o d'altres proteïnes reguladores del zinc també pot ser una bona estratègia. Si seguim aquest camí, ens podem trobar a curt o a mitjà termini amb unes eines interessants per a la recerca, les quals poden tenir aplicació clínica a llarg termini en el tractament de les lesions neuronals esmentades abans.

AGRAÏMENTS

Les fotografies presentades i el treball experimental al qual fan referència han estat realitzats pel nostre Grup de Neurobiologia del Zinc del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Barcelona, en particular per la doctora Carme Casanovas i Aguilar i els estudiants de doctorat Carles Balet i Sindreu, Neus Miró i Bernié, i Àngela Riba i Bosch. Agraeixo especialment a la doctora Mercè Durfort l'organització d'aquests actes de commemoració del naixement de Santiago Ramón y Cajal. Els treballs esmentats han estat subvencionats pel Ministeri d'Educació i Cultura (PM97-0048-CO2-02) i el Ministeri de Sanitat i Consum (FIS 01/0096-02).

BIBLIOGRAFIA

- AKAI, F.; YANAGIHARA, T. (1993). «Identity of the dorsal hippocampal region most vulnerable to cerebral ischemia». *Brain Res.*, núm. 603, p. 87-95.
- ANDRASI, E.; IGAZ, S.; SZOBOSZLAI, N.; FARKAS, E.; AJTONY, Z. (1999). «Several methods to determine heavy-metals in the human brain». *Spectrochim. Acta Pt. B At. Spec.*, núm. 54:, p. 819-825.
- ASCHNER, M. (1996). «The functional significance of brain metallothioneins». *FASEB J.*, núm. 10, p. 1129-1136.
- ASSAF, S. Y.; CHUNG, S. H. (1984). «Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity». *Nature*, núm. 308, p. 734-736.
- BALET-SINDREU, C.; VAROQUI, H.; ERICKSON, J. D.; PÉREZ-CLAUSELL, J. (2003). «Boutons containing vesicular zinc define a subpopulation of synapses with low AMPAR content in rat hippocampus». *Cerebral Cortex*, núm. 13, p. 823-829.
- BEAULIEU, C.; DYCK, R.; CYNADER, M. (1992). «Enrichment of glutamate in zinc-containing terminals of the cat visual cortex». *NeuroReport*, núm. 3, p. 861-864.
- BEN ARI, Y. (1985). «Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy». *Neuroscience*, núm. 14, p. 375-403.
- BEN ARI, Y.; COSSART, R. (2000). «Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress». *Trends Neurosci.*, núm. 23, p. 580-587.
- BERG, J. M.; SHI, Y. (1996). «The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc». *Science*, núm. 271, p. 1081-1085.
- BUSH, A. I.; PETTINGELL, W. H.; MULTHAUP, G.; PARADIS, M.; VONSATTEL, J. P.; GUSELLA, J. F.; BEYREUTHER, K.; MASTERS, C. L.; TANZI, R. E. (1994). «Rapid induction of Alzheimer A beta amyloid formation by zinc». *Science*, núm. 265, p. 1464-1467. [Vegeu els comentaris]
- CASANOVAS-AGUILAR, C.; CHRISTENSEN, M. K.; REBLET, C.; MARTÍNEZ-GARCIA, F.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; BUENO-LÓPEZ, J. L. (1995). «Callosal neurones give rise to zinc-rich boutons in the rat visual cortex». *NeuroReport*, núm. 6, p. 497-500.
- CASANOVAS-AGUILAR, C.; MIRO-BERNIE, N.; PÉREZ-CLAUSELL, J. (2002). «Zinc-rich neurones in the rat visual cortex give rise to two laminar segregated systems of connections». *Neuroscience*, núm. 110, p. 445-458.
- CASANOVAS-AGUILAR, C.; REBLET, C.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; BUENO-LÓPEZ, J. L. (1998). «Zinc-rich afferents to the rat neocortex: projections to the visual cortex traced with intracerebral selenite injections». *J. Chem. Neuroanat.*, núm. 15, p. 97-109.
- CAVAZOS, J. E.; SUTULA, T. P. (1990). «Progressive neuronal loss induced by kindling: a possible mechanism for mossy fiber synaptic reorganization and hippocampal sclerosis». *Brain Res.*, núm. 527, p. 1-6. [Fe d'errates publicada a *Brain Res.*, vol. 1, núm. 541 (8 febrer 1991), p. 179]
- CHOI, D. W. (1988). «Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system». *Neuron*, núm. 1, p. 623-634.
- CHOI, D. W.; KOH, J. Y. (1998). «Zinc and brain injury». *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 21, p. 347-375.
- CHRISTENSEN, M. K.; GENESER, F. A. (1995). «Distribution of neurons of origin of zinc-

- containing projections in the amygdala of the rat». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 191, p. 227-237.
- 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 Res.*, núm. 39, p. 153-169.
- COLVIN, R. A.; DAVIS, N.; NIPPER, R. W.; CARTER, P. A. (2000). «Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 1484S-1487S.
- CUAJUNGCO, M. P.; LEES, G. J. (1997). «Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders». *Neurobiol. Dis.*, núm. 4, p. 137-169.
- DANSCHER, G. (1981). «Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy». *Histochemistry*, núm. 71, p. 1-16.
- (1982). «Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds». *Histochemistry*, núm. 76, p. 281-293.
- DANSCHER, G.; JENSEN, K. B.; FREDERICKSON, C. J.; KEMP, K.; ANDREASEN, A.; JUHL, S.; STOLTENBERG, M.; RAVID, R. (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». *J. Neurosci. Methods*, núm. 76, p. 53-59.
- DUDEK, F. E.; SPITZ, M. (1997). «Hypothetical mechanisms for the cellular and neurophysiologic basis of secondary epileptogenesis: proposed role of synaptic reorganization». *J. Clin. Neurophysiol.*, núm. 14, p. 90-101. [Fe d'errates publicada a *J. Clin. Neurophysiol.*, vol. 5, núm. 14 (1997), p. 459]
- DYCK, R.; BEAULIEU, C.; CYNADER, M. (1993). «Histochemical localization of synaptic zinc in the developing cat visual cortex». *J. Comp. Neurol.*, núm. 329, p. 53-67.
- EBADI, M.; PERINI, F.; MOUNTJOY, K.; GARVEY, J. S. (1996). «Amino acid composition, immunoreactivity, sequence analysis, and function of bovine hippocampal metallothionein isoforms». *J. Neurochem.*, núm. 66, p. 2121-2127.
- ESLER, W. P.; STIMSON, E. R.; JENNINGS, J. M.; GHILARDI, J. R.; MANTYH, P. W.; MAGGIO, J. E. (1996). «Zinc-induced aggregation of human and rat beta-amyloid peptides in vitro». *J. Neurochem.*, núm. 66, p. 723-732.
- FOSMIRE, G. J.; AL-UBAIDI, Y. Y.; SANDSTEAD, H. H. (1975). «Some effects of postnatal zinc deficiency on developing rat brain». *Pediatr. Res.*, núm. 9, p. 89-93.
- FRANCO-PONS, N.; CASANOVAS-AGUILAR, C.; ARROYO, S.; RUMIA, J.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. (2000). «Zinc-rich synaptic boutons in human temporal cortex biopsies». *Neuroscience*, núm. 98, p. 429-435.
- FREDERICKSON, C. J.; BUSH, A. I. (2001). «Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects». *Biometals*, núm. 14, p. 353-366.
- FREDERICKSON, C. J.; DANSCHER, G. (1988). «Hippocampal zinc, the storage granule pool: Localization, physiochemistry, and possible functions». A: MORLEY, J. E.; STERMAN, M. B.; WALSH, J. H. [ed.]. *Nutritional modulation of brain function*. San Diego: Academic Press, p. 289-306.

- FREDERICKSON, C. J.; KASARSKIS, E. J.; RINGO, D.; FREDERICKSON, R. E. (1987a). «A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain». *J. Neurosci. Methods*, núm. 20, p. 91-103.
- FREDERICKSON, C. J.; KLITENICK, M. A.; MANTON, W. I.; KIRKPATRICK, J. B. (1983). «Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat». *Brain Res.*, núm. 273, p. 335-339.
- FREDERICKSON, C. J.; MANTON, W. I.; FREDERICKSON, M. H.; HOWELL, G. A.; MALLORY, M. A. (1982). «Stable-isotope dilution measurement of zinc and lead in rat hippocampus and spinal cord». *Brain Res.*, núm. 246, p. 338-341.
- FREDERICKSON, C. J.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. (1987b). «Zinc-containing 7S-NGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules». *J. Histochem. Cytochem.*, núm. 35, p. 579-583.
- FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D.; FREDERICKSON, C. J.; THOMPSON, R. B. (2000). «Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 1471S-1483S.
- 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». *J. Comp. Neurol.*, núm. 223, p. 88-109.
- GAITHER, L. A.; EIDE, D. J. (2001). «Eukaryotic zinc transporters and their regulation». *Bio-metals*, núm. 14, p. 251-270.
- GARRETT, B.; SØRENSEN, J. C.; SLOMIANKA, L. (1992). «Fluoro-Gold tracing of zinc-containing afferent connections in the mouse visual cortices». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 185, p. 451-459.
- GRAY, E. G. (1959). «Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron-microscope study». *J. Anat.*, núm. 93, p. 420-433.
- HARRISON, N. L.; GIBBONS, S. J. (1994). «Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels». *Neuropharmacology*, núm. 33, p. 935-952.
- HAUG, F.-M. S. (1967). «Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure». *Histochemie*, núm. 8, p. 355-368.
- (1973). «Heavy metals in the brain. A light microscope study of the rat with Timm's sulphide silver method. Methodological considerations and cytological and regional staining patterns». *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, núm. 47, p. 1-71.
- HESSE, G. W. (1979). «Chronic zinc deficiency alters neuronal function of hippocampal mossy fibers». *Science*, núm. 205, p. 1005-1007.
- HOWELL, G. A.; FREDERICKSON, C. J. (1990). «A retrograde transport method for mapping zinc-containing fiber systems in the brain». *Brain Res.*, núm. 515, p. 277-286.
- HOWELL, G. A.; WELCH, M. G.; FREDERICKSON, C. J. (1984). «Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices». *Nature*, núm. 308, p. 736-738.
- INTERNATIONAL ZINC ASSOCIATION. <<http://www.zinc.org>>
- JO, S. M.; DANSCHER, G.; SCHRÖDER, H. D.; WON, M. H.; COLE, T. B. (2000). «Zinc-enriched (ZEN) terminals in mouse spinal cord: immunohistochemistry and autoradiography». *Brain Res.*, núm. 870, p. 163-169.
- KLITENICK, M. A.; FREDERICKSON, C. J.; MANTON, W. I. (1983). «Acid-vapor decomposi-

- tion for determination of zinc in brain tissue by isotope dilution mass spectrometry». *Anal. Chem.*, núm. 55, p. 921-923.
- KOH, J. Y.; SUH, S. W.; GWAG, B. J.; HE, Y. Y.; HSU, C. Y.; CHOI, D. W. (1996). «The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia». *Science*, núm. 272, p. 1013-1016.
- LARSON, A. A.; GIOVENGO, S. L.; SHI, Q.; VELAZQUEZ, R. A.; KOVÁCS, K. J. (2000). «Zinc in the extracellular area of the central nervous system is necessary for the development of kainic acid-induced persistent hyperalgesia in mice». *Pain*, núm. 86, p. 177-184.
- LEES, G. J.; CUAJUNCO, M. P.; LEONG, W. (1998). «Effect of metal chelating agents on the direct and seizure-related neuronal death induced by zinc and kainic acid». *Brain Res.*, núm. 799, p. 108-117.
- LÓPEZ-GARCÍA, C.; MOLOWNY, A.; PÉREZ-CLAUSELL, J. (1983). «Volumetric and densitometric study in the cerebral cortex and septum of a lizard (*Lacerta galloti*) using the Timm method». *Neurosci. Lett.*, núm. 40, p. 13-18.
- LOVELL, M. A.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R. (1999). «Protection against amyloid beta peptide toxicity by zinc». *Brain Res.*, núm. 823, p. 88-95.
- MANTYH, P. W.; GHILARDI, J. R.; ROGERS, S.; DEMASTER, E.; ALLEN, C. J.; STIMSON, E. R.; MAGGIO, J. E. (1993). «Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide». *J. Neurochem.*, núm. 61, p. 1171-1174.
- MARTÍNEZ-GUIJARRO, F. J.; SORIANO, E.; RÍO, J. A. del; LÓPEZ-GARCÍA, C. (1991). «Zinc-positive boutons in the cerebral cortex of lizards show glutamate immunoreactivity». *J. Neurocytol.*, núm. 20, p. 834-843.
- MENGUAL, E.; CASANOVAS-ÁGUILAR, C.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; GIMENEZ-AMAYA, J. M. (2001). «Thalamic distribution of zinc-rich terminal fields and neurons of origin in the rat». *Neuroscience*, núm. 102, p. 863-884.
- (1995). «Heterogeneous and compartmental distribution of zinc in the striatum and globus pallidus of the rat». *Neuroscience*, núm. 66, p. 523-537.
- MULTHAUP, G.; BUSH, A. I.; POLLWEIN, P.; MASTERS, C. L. (1994). «Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP)». *FEBS Lett.*, núm. 355, p. 151-154.
- OLNEY, J. W.; DEGUBAREFF, T.; SLOVITER, R. S. (1983). «"Epileptic" brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of acute hippocampal pathology». *Brain Res. Bull.*, núm. 10, p. 699-712.
- ONO, S.; CAI, L.; CHERIAN, M. G. (1998). «Effects of gamma radiation on levels of brain metallothionein and lipid peroxidation in transgenic mice». *Radiat. Res.*, núm. 150, p. 52-57.
- ONO, S.; CHERIAN, M. G. (1998). «Changes in brain metallothionein and zinc during development in transgenic mice». *Biol. Trace Elem. Res.*, núm. 61, p. 41-49.
- ONO, S.; KOROPATNICK, D. J.; CHERIAN, M. G. (1997). «Regional brain distribution of metallothionein, zinc and copper in toxic milk mutant and transgenic mice». *Toxicology*, núm. 124, p. 1-10.
- PALMITER, R. D.; COLE, T. B.; FINDLEY, S. D. (1996a). «ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration». *EMBO J.*, núm. 15, p. 1784-1791.

- PALMITER, R. D.; COLE, T. B.; QUAIFFE, C. J.; FINDLEY, S. D. (1996*b*). «ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 93, p. 14934-14939.
- PENKOWA, M.; GIRALT, M.; THOMSEN, P. S.; CARRASCO, J.; HIDALGO, J. (2001). «Zinc or copper deficiency-induced impaired inflammatory response to brain trauma may be caused by the concomitant metallothionein changes». *J. Neurotrauma*, núm. 18, p. 447-463.
- PENKOWA, M.; NIELSEN, H.; HIDALGO, J.; BERNTH, N.; MOOS, T. (1999). «Distribution of metallothionein-I plus Metallothionein-II and vesicular zinc in the developing central-nervous-system: Correlative study in the rat». *J. Comp. Neurol.*, núm. 412, p. 303-318.
- PENLAND, J. G. (2000). «Behavioral data and methodology issues in studies of zinc nutrition in humans». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 361S-364S.
- PÉREZ-CLAUSELL, J. (1988). «Organization of zinc-containing terminal fields in the brain of the lizard *Podarcis hispanica*: a histochemical study». *J. Comp. Neurol.*, núm. 267, p. 153-171.
- (1996). «Distribution of terminal fields stained for zinc in the neocortex of the rat». *J. Chem. Neuroanat.*, núm. 11, p. 99-111.
- PÉREZ-CLAUSELL, J.; DANSCHER, G. (1985). «Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study». *Brain Res.*, núm. 337, p. 91-98.
- PÉREZ-CLAUSELL, J.; FREDERICKSON, C. J.; DANSCHER, G. (1989). «Amygdaloid efferents through the stria terminalis in the rat give origin to zinc-containing boutons». *J. Comp. Neurol.*, núm. 290, p. 201-212.
- PETERS, S.; KOH, J.; CHOI, D. W. (1987). «Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons». *Science*, núm. 236, p. 589-593.
- PIÑUELA, C.; BAATRUP, E.; GENESER, F. A. (1992*a*) «Histochemical distribution of zinc in the brain of the rainbow trout, *Oncorhynchus myciss*. I: The telencephalon». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 185, p. 379-388.
- (1992*b*) «Histochemical distribution of zinc in the brain of the rainbow trout, *Oncorhynchus myciss*. II: The diencephalon». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 186, p. 275-284.
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1889). «Nuevas aplicaciones del método de coloración de Golgi». *Gaceta Médica Catalana* (1 octubre).
- ROLFS, A.; HEDIGER, M. A. (1999). «Metal-ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications». *J. Physiol.* [London], núm. 518, p. 1-12.
- ROSSI, D. J.; OSHIMA, T.; ATTWELL, D. (2000). «Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake». *Nature*, núm. 403, p. 316-321.
- SAITO, T.; TAKAHASHI, K.; NAKAGAWA, N.; HOSOKAWA, T.; KURASAKI, M.; YAMANOSHITA, O.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, H.; NAGASHIMA, K.; FUJITA, H. (2000). «Deficiencies of hippocampal Zn and ZnT3 accelerate brain aging of Rat». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 279, p. 505-511.
- SÁNCHEZ-ANDRÉS, J. V.; PALOP, J. J.; RAMÍREZ, C.; NÁCHER, J.; MOLOWNY, A.; LÓPEZ-GARCÍA, C. (1997). «Zinc-positive presynaptic boutons of the rabbit hippocampus during early postnatal development». *Brain Res. Dev. Brain Res.*, núm. 103, p. 171-183.
- SANDSTEAD, H. H. (2000). «Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain». *J. Nutr.*, núm. 130 (5 supl.), p. 347S-349S.

- SCHRÖDER, H. D.; DANSCHER, G.; JO, S. M.; SU, H. (2000). «Zinc-enriched boutons in rat spinal cord». *Brain Res.*, núm. 868, p. 119-122.
- SENSI, S. L.; YIN, H. Z.; WEISS, J. H. (1999). «Glutamate triggers preferential Zn²⁺ flux through Ca²⁺ permeable AMPA channels and consequent ROS production». *Neuro-Report*, núm. 10, p. 1723-1727.
- (2000). «AMPA/kainate receptor-triggered Zn²⁺ entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn²⁺ uptake and persistent mitochondrial dysfunction». *Eur. J. Neurosci.*, núm. 12, p. 3813-3818.
- SLOMIANKA, L.; DANSCHER, G.; FREDERICKSON, C. J. (1990). «Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite». *Neuroscience*, núm. 38, p. 843-854.
- SLOVITER, R. S. (1994). «The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy». *Ann. Neurol.*, núm. 35, p. 640-654.
- SMART, T. G.; XIE, X.; KRISHEK, B. J. (1994). «Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc». *Prog. Neurobiol.*, núm. 42, p. 393-441.
- SMEETS W. J.; PÉREZ-CLAUSELL, J.; GENESER, F. A. (1989). «The distribution of zinc in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko*. A histochemical study». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 180, p. 45-56.
- SØRENSEN, J. C.; SLOMIANKA, L.; CHRISTENSEN, J.; ZIMMER, J. (1995). «Zinc-containing telencephalic connections to the rat striatum: a combined Fluoro-Gold tracing and histochemical study». *Exp. Brain Res.*, núm. 105, p. 370-382.
- SØRENSEN, J. C.; TØNDER, N.; SLOMIANKA, L. (1993). «Zinc-positive afferents to the rat septum originate from distinct subpopulations of zinc-containing neurons in the hippocampal areas and layers. A combined fluoro-gold tracing and histochemical study». *Anat. Embryol.* [Berlín], núm. 188, p. 107-115.
- SUH, S. W.; CHEN, J. W.; MOTAMED, M.; BELL, B.; LISTIAK, K.; PONS, N. F.; DANSCHER, G.; FREDERICKSON, C. J. (2000). «Evidence that synaptically-released zinc contributes to neuronal injury after traumatic brain injury». *Brain Res.*, núm. 852, p. 268-273.
- TAKEDA, A. (2000). «Movement of zinc and its functional significance in the brain». *Brain Res. Brain Res. Rev.*, núm. 34, p. 137-148.
- (2001). «Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain». *Biometals*, núm. 14, p. 343-351.
- TANAKA, D., Jr. (1987). «Differential laminar distribution of corticostriatal neurons in the prefrontal and pericruciate gyri of the dog». *J. Neurosci.*, núm. 7, p. 4095-4106.
- UNIVERSITAT TUFTS. <<http://nutrition.tufts.edu>>
- VAROQUI, H.; SCHAFER, M. K.; ZHU, H.; WEIHE, E.; ERICKSON, J. D. (2002). «Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses». *J. Neurosci.*, núm. 22, p. 142-155.
- VELÁZQUEZ, R. A.; CAI, Y.; SHI, Q.; LARSON, A. A. (1999). «The distribution of zinc selenite and expression of metallothionein-III mRNA in the spinal cord and dorsal root ganglia of the rat suggest a role for zinc in sensory transmission». *J. Neurosci.*, núm. 19, p. 2288-2300.

- VOGT, K.; MELLOR, J.; TONG, G.; NICOLL, R. (2000). «The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses». *Neuron*, núm. 26, p. 187-196.
- WESTBROOK, G. L.; MAYER, M. L. (1987). «Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons». *Nature*, núm. 328, p. 640-643.
- XU, H.; MITCHELL, C. L. (1993). «Chelation of zinc by diethyldithiocarbamate facilitates bursting induced by mixed antidromic plus orthodromic activation of mossy fibers in hippocampal slices». *Brain Res.*, núm. 624, p. 162-170.
- YANAGITANI, S.; MIYAZAKI, H.; NAKAHASHI, Y.; KUNO, K.; UENO, Y.; MATSUSHITA, M.; NAITOH, Y.; TAKETANI, S.; INOUE, K. (1999). «Ischemia induces metallothionein III expression in neurons of rat brain». *Life Sci.*, núm. 64, p. 707-715.
- YANG, Y.; TANDON, P.; LIU, Z.; SARKISIAN, M. R.; STAFSTROM, C. E.; HOLMES, G. L. (1998). «Synaptic reorganization following kainic acid-induced seizures during development». *Brain Res. Dev. Brain Res.*, núm. 107, p. 169-177.