

# RESULTADOS

## 1 DISTRIBUCIÓN EXTRAHEPÁTICA DE LA ADH EN RATA

El estudio de la distribución tisular de la ADH en rata y humano ha supuesto una continuación de la línea iniciada en el grupo hace unos años (Boleda y col., 1989; Julià y col., 1983; 1986; 1987b; Moreno y col., 1994). Para ello se han utilizado técnicas clásicas, tales como los ensayos de actividad en condiciones específicas para la detección de diferentes formas de ADH, y la electroforesis en gel de almidón y posterior tinción por actividad ADH. Además, con el objeto de localizar las células que expresan los genes de ADH en un determinado tejido, se han desarrollado y puesto a punto técnicas como la hibridación *in situ* (ISH), inmunohistoquímica (IHC) e histoquímica.

### 1.1 Localización de ADH en el sistema vascular

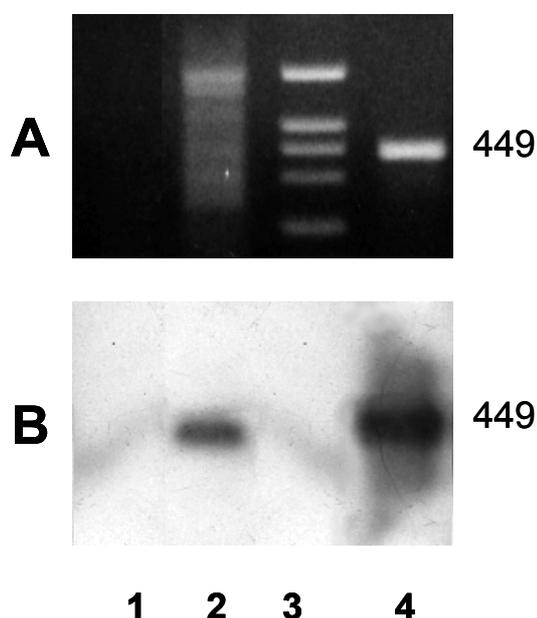
#### 1.1.1 Detección de la actividad ADH mediante electroforesis en gel de almidón

La electroforesis en gel de almidón y tinción por actividad mostró ADH4 como la forma principal de los vasos en rata, presente en todas las arterias y venas analizadas (vena porta, venas cava superior e inferior, vena yugular y la arteria carótida). A diferencia de los vasos humanos, no se detectó ADH1, y ADH3 apareció como una banda, débil, en todos los tejidos vasculares analizados (Allali-Hassani y col., 1997). Los niveles de actividad ADH4, determinada en los ensayos de actividad, fueron muy similares en todos los vasos estudiados (3,8-6,5 mU/mg de proteína; Allali-Hassani y col., 1997).

#### 1.1.2 Detección del mRNA de ADH4 mediante RT-PCR quimioluminiscente.

Fue prácticamente imposible la obtención de una concentración de RNA de vasos suficientemente alta para la detección del mRNA de ADH4 por análisis por

transferencia *Northern*. Ello hizo que nos decantásemos por la RT-PCR y la subsiguiente hibridación con una sonda específica. Esta técnica permitió detectar el cDNA de ADH4 a partir de muy poca cantidad de RNA (~ 1 µg). Así pues, a partir de una alícuota de la mezcla de reacción de síntesis de cDNA, se procedió a la amplificación por PCR utilizando los cebadores degenerados RataADH4-1 y RataADH4-6 (Tabla 8 de Material y métodos), específicos para ADH4 de estómago de rata. Los productos de la amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) (Fig. 13A) y se transfirieron a una membrana para la posterior detección de ADH4. El resultado de la autorradiografía, tras la hibridación con una sonda homóloga de ADH4 de rata marcada con digoxigenina, mostró una banda de 449 pb en los vasos, idéntica a la detectada en estómago, correspondiente a los aminoácidos 138-286 (Crosas y col., 2000; Farrés y col., 1994) (Fig. 13B).

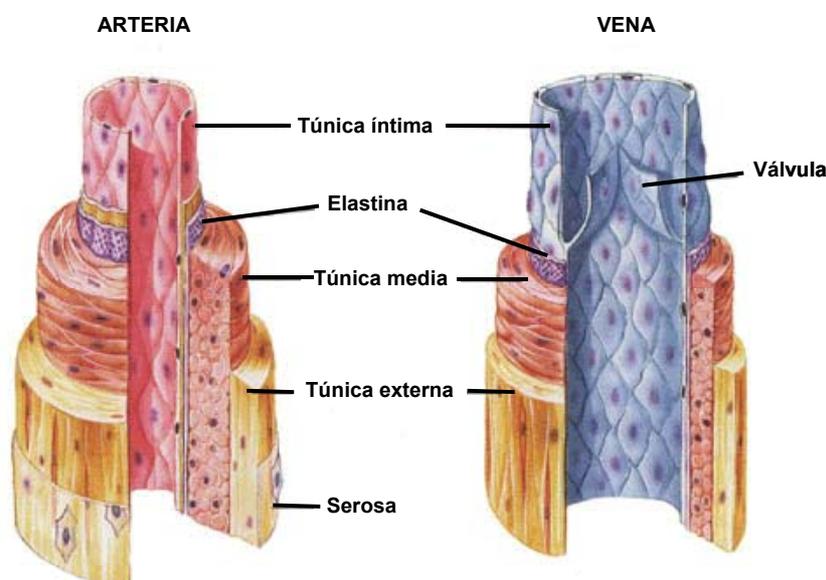


**Figura 13. Detección del mRNA de ADH4 en los vasos sanguíneos de rata por RT-PCR. A**, gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. **B**, Membrana hibridada con una sonda específica para ADH4 de rata. Detección quimioluminiscente. **1**, muestra control a la que no se ha añadido DNA molde; **2**, producto de PCR de vasos sanguíneos; **3**, DNA marcador pBR328 digerido con *Bgl*I y *Hin*fl (tipo VI, Roche); **4**, productos de PCR de estómago de rata. La banda de 449 pb es un fragmento de cDNA de ADH4.

### 1.1.3 Detección de la actividad ADH por tinción histoquímica.

La organización básica de la pared de todas las arterias es parecida (Fig. 14). En ella pueden distinguirse tres capas concéntricas: 1) la túnica íntima, una capa interna constituida por endotelio, epitelio plano delgado, separado de la lámina elástica interna por tejido conjuntivo laxo con unos pocos fibroblastos, pocas células musculares lisas y escasas fibras elásticas y colágenas; 2) la túnica media, constituida predominantemente por células musculares lisas dispuestas circularmente; y 3) la túnica adventicia, la capa externa constituida por fibroblastos, y elementos fibrosos que están orientados, en su mayor parte, longitudinalmente. Esta capa se funde gradualmente con el tejido conjuntivo que acompaña a todos los vasos sanguíneos. La

estructura del sistema venoso presenta la disposición general del conjunto del sistema circulatorio, pero los componentes elásticos y musculares están mucho menos desarrollados (Fig. 14).



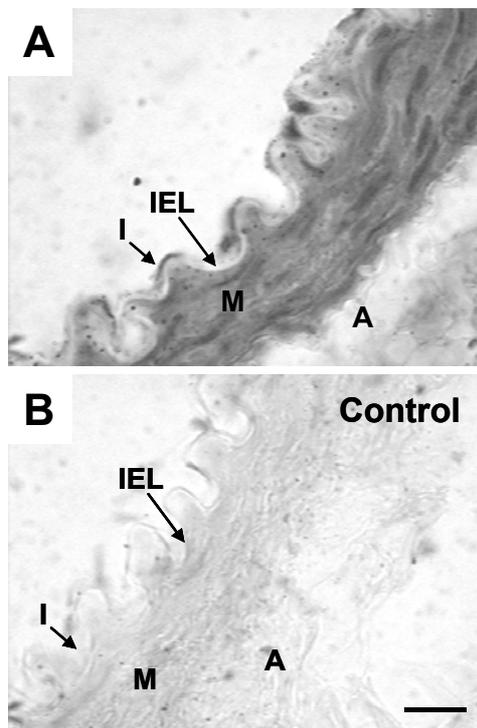
**Figura 14. Estructura de una arteria y una vena donde se especifican las diferentes capas histológicas.** Modificado de [www.sonofsun.sdsu.edu](http://www.sonofsun.sdsu.edu).

La tinción histoquímica de arterias y venas de rata, en condiciones óptimas para la detección de ADH4 de rata (en presencia de 4-metilpirazol, para inhibir la posible contribución de ADH1), mostró la actividad enzimática localizada en la túnica íntima y media y ninguna actividad en la capa adventicia. También se detectó presencia de ADH4 en la monocapa de células endoteliales en contacto con la luz del vaso (Fig. 15).

Finalmente, el estudio de diferentes tejidos de rata mediante las técnicas de ISH, IHC e histoquímica mostraron la presencia de ADH4, tanto a nivel de mRNA como de la proteína, en las arterias, arteriolas, vénulas y capilares asociados a los tejidos (ver apartados siguientes). En los capilares del tejido nervioso, compuestos tan sólo de la capa endotelial de la túnica íntima, también se detectó el mRNA de ADH1 (ver apartado 1.3.4 de Resultados).

## 1.2 Localización de la ADH en el tracto gastrointestinal

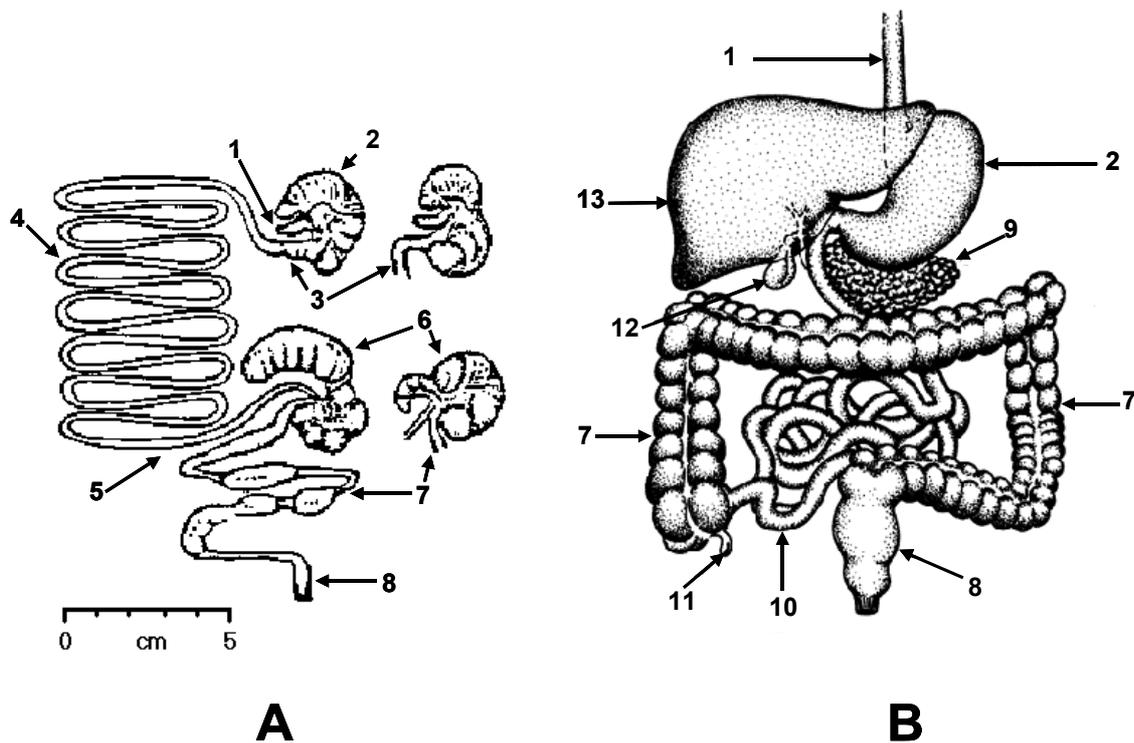
El sistema gastrointestinal es, en esencia, un tubo muscular revestido internamente por una membrana mucosa, que presenta diferencias estructurales regionales que reflejan las diferentes funciones del sistema desde la boca hasta el ano (Fig. 16).



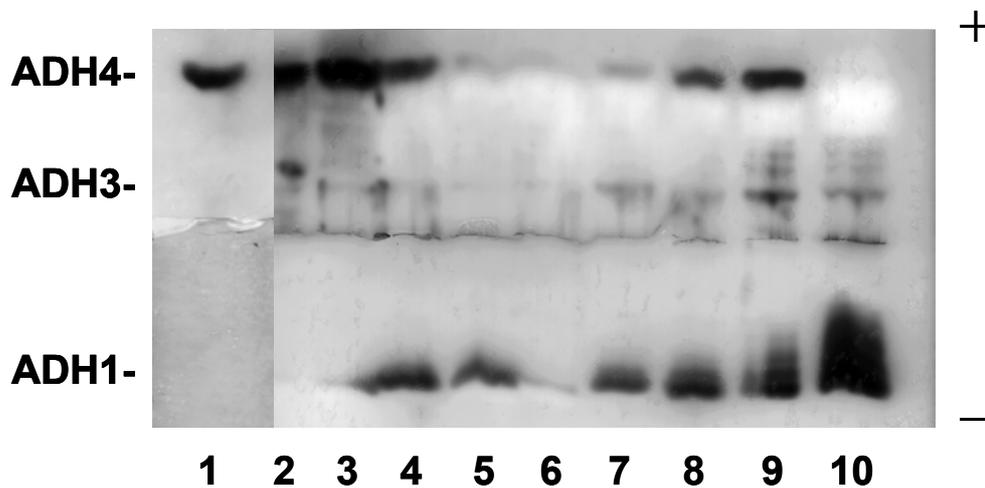
**Figura 15. Detección histoquímica de ADH de secciones de arteria de rata.** La tinción por actividad ADH se llevó a cabo en presencia de etanol 500 mM y de 4-MP 2 mM (A). Sección control en la que el sustrato no fue añadido a la solución de tinción (B). A, túnica adventicia; I, túnica íntima; IEL, lámina elástica interna; M, túnica media. Barra de calibración (mostrada en B): 20  $\mu$ m.

### 1.2.1 Detección de la actividad ADH en tejido gastrointestinal

Diferentes técnicas fueron utilizadas, con el objeto de localizar las formas de ADH en las distintas regiones del tracto gastrointestinal y determinar la contribución de cada clase a la actividad total ADH en cada región. El análisis de los homogeneizados de diferentes regiones del tracto gastrointestinal de rata, por electroforesis en gel de almidón y tinción del gel por actividad enzimática con alcohol crotilico (2-buten-1-ol), mostró la presencia de bandas de actividad características de ADH1, ADH3 y ADH4 en todos los tejidos estudiados (Fig. 17). La intensidad de las bandas ADH1 fue elevada, además de en hígado (tejido utilizado como control), en recto, colon, ciego, yeyuno y duodeno, siendo muy tenue, o casi indistinguible, en íleon, estómago, esófago y lengua. Por el contrario, ADH4 fue predominante en lengua, esófago, estómago, colon y recto, las partes más externas de tracto gastrointestinal, aunque también se detectó en el intestino delgado y en otras partes del grueso de forma tenue. ADH3 se detectó en todas las regiones estudiadas (Fig. 17).



**Figura 16. Esquema del tracto gastrointestinal de la rata (A) y humano (B).** 1, esófago; 2, estómago; 3, duodeno; 4, yeyuno; 5, íleon; 6, ciego; 7, colon; 8, recto; 9, páncreas; 10, intestino delgado; 11, apéndice; 12, vesícula biliar; 13, hígado.



**Figura 17. Electroforesis en gel de almidón de homogeneizados del tracto gastrointestinal de rata.** La tinción por actividad del gel se realizó con alcohol crótilico 100 mM como sustrato. 1, lengua; 2, esófago; 3, estómago; 4, duodeno; 5, yeyuno; 6, íleon; 7, ciego; 8, colon; 9, recto y 10, hígado.