

1.2.2 Detección de actividad ADH

La actividad enzimática se determinó en condiciones de ensayo que permitieron conocer la contribución de ADH1 y ADH4 a la actividad total. Así, los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo en tampón fosfato monosódico 50 mM, pH 7,5, con etanol 10 mM para estimar ADH1 y con etanol 1 M para estimar, mayoritariamente, ADH4 (Fig. 18). A pH 7,5 la contribución de ADH3 es prácticamente insignificante (Julià y col. 1987b).

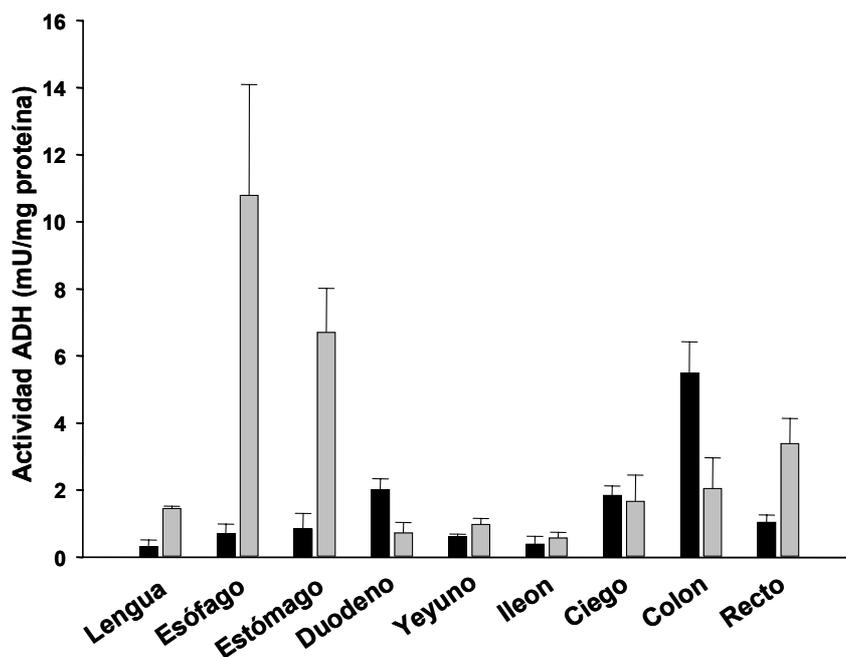


Figura 18. Actividad ADH a lo largo del tracto gastrointestinal. Representación gráfica de la actividad ADH con etanol 10 mM (barras negras) y 1 M (barras grises), en diferentes partes del tubo digestivo. Las actividades se midieron en tampón fosfato monosódico 0,1 M, pH 7,5 a 25°C en presencia de etanol 10 mM o 1 M y NAD^+ 2,4 mM. La actividad ADH se expresa como la media \pm SEM de las medidas espectrofotométricas en homogeneizados de cinco experimentos independientes.

El análisis electroforético y los ensayos de actividad demostraron de manera inequívoca que los dos enzimas, ADH1 y ADH4, estaban distribuidos a lo largo de todo el tracto digestivo de la rata: ADH1 mayoritaria en el intestino y ADH4 predominante en la parte superior (lengua, esófago y estómago) e inferior (colon y recto) aunque detectada en todas las regiones del tubo.

1.2.3 Inmunodetección de ADH4 en tejido gastrointestinal de rata

La inmunodetección de ADH4 en los homogeneizados de diferentes regiones del tracto gastrointestinal se llevó a cabo con anticuerpos policlonales específicos para ADH4 de ratón (Haselbeck y col., 1997a). El análisis por transferencia *Western* mostró bandas con idéntica movilidad a ADH4 en todas las regiones analizadas, muy intensas en lengua, esófago y estómago y de intensidad menor en colon y recto (Fig. 19). En el resto del intestino, la intensidad fue más baja y similar en las diferentes áreas estudiadas (Fig. 19, carriles 4-7).

Experimentos control de transferencia *Western* con proteínas recombinantes puras ADH1 y ADH3 de rata, demostraron que el anticuerpo anti-ADH4 detectaba exclusivamente la proteína ADH4 y que no presentaban reacción cruzada con las otras clases (resultados mostrados).

Estos resultados mostraban, por una parte, que los anticuerpos anti-ADH4 de ratón (Haselbeck y col., 1997a) eran específicos para la detección de ADH4 de rata y por otra, que los niveles de proteína detectados se correlacionaban con los de actividad medidos con etanol 1M como sustrato (Fig. 18). Por lo tanto, los anticuerpos resultaban adecuados para llevar a cabo el análisis por inmunohistoquímica de las secciones del tracto gastrointestinal de rata.

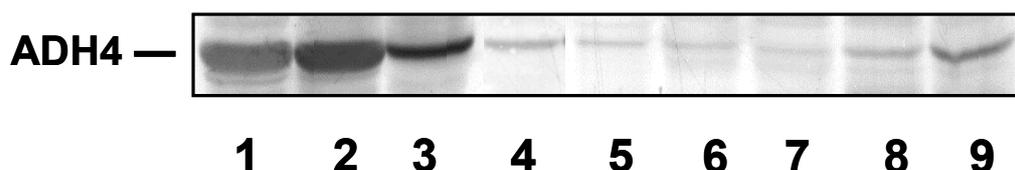


Figura 19. Inmunodetección de ADH4 en el tracto gastrointestinal de rata. Se analizaron 30 μg de proteína de homogeneizados de diferentes regiones del tracto digestivo de rata por transferencia *Western*. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos contra ADH4. **1**, lengua; **2**, esófago; **3**, estómago; **4**, duodeno; **5**, yeyuno; **6**, íleon; **7**, ciego; **8**, colon y **9**, recto.

1.2.4 Localización celular de la ADH en el tracto gastrointestinal mediante ISH e IHC.

En esta parte de la memoria, una breve descripción de la histología del tracto gastrointestinal permitirá interpretar más fácilmente los resultados obtenidos. El tracto gastrointestinal es, esencialmente, un tubo muscular revestido internamente por una mucosa. La disposición del componente muscular permanece relativamente constante a lo largo de todo el tubo, mientras que la mucosa presenta importantes variaciones en las diferentes regiones del tracto. El tracto gastrointestinal posee cuatro capas

funcionales: mucosa, submucosa, muscular y adventicia. La mucosa se divide, histológicamente, en tres capas: una capa de revestimiento epitelial, una capa de tejido conectivo denominada lámina propia y una capa fina de musculatura lisa, la *muscularis mucosae*, que origina movimientos locales y plegamientos de la mucosa (Fig. 20). En diversos puntos a lo largo del tracto, la mucosa sufre una brusca transición de una forma a otra: estos puntos son la unión esofagogástrica, la unión gastroduodenal, la unión ileocecal y la unión rectoanal. La submucosa, es una capa de tejido conectivo laxo que sostiene la mucosa y contiene grandes vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La muscular propia está formada por músculo liso que se subdivide en dos capas histológicas: una capa circular interna y una capa externa longitudinal. La acción de estas capas musculares lisas colocadas perpendiculares entre sí, es la base de la contracción peristáltica. Y por último, la adventicia, capa externa de tejido conectivo con vasos mayores y nervios (Fig. 20).

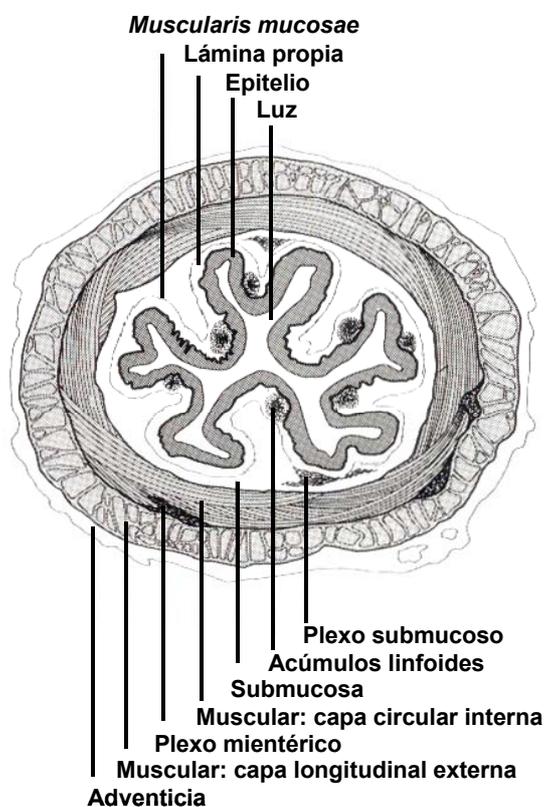


Figura 20. Sección transversal del tubo digestivo (esófago). Se indican las capas funcionales e histológicas.

Las técnicas de ISH e IHC permitieron examinar con precisión el patrón de expresión de ambas clases (ADH1 y ADH4) a lo largo de todo el tracto gastrointestinal de la rata adulta. En la técnica de ISH, la señal de hibridación correspondiente a cada una de las sondas de ADH1 y ADH4, en las secciones de tejido, fue muy específica, lo que quedaba contrastado con los controles de hibridación con las respectivas sondas sentido. Además, los experimentos de ISH se llevaron a cabo en condiciones que impidieran la hibridación cruzada de las sondas con las diferentes ADH. En el caso de la técnica de IHC, con anticuerpos contra ADH4 (Haselbeck y col., 1997a), la señal obtenida fue también específica, como lo demostraron los controles correspondientes, que incluían la omisión del primer anticuerpo o el uso del anticuerpo pre-incubado con la proteína ADH4 recombinante inmunogénica.

Los resultados obtenidos mostraron que ambas clases se expresaban en todas las regiones estudiadas pero su respectiva localización estaba confinada en diferentes capas y tipos celulares en función de la región del tracto gastrointestinal analizada. ADH4, además, también se localizó en los vasos y capilares sanguíneos que nutren el sistema digestivo.

1.2.4.1 Lengua

A nivel histológico, la lengua básicamente, es un órgano muscular tapizado por mucosa oral. El cuerpo de la lengua está formado por haces entrelazados de fibras de musculatura esquelética que permiten la amplia variedad de movimientos de este órgano. La mucosa que cubre la lengua esta unida fuertemente a la capa muscular por una lámina propia de colágeno densa que se continúa con el epimisisio de la musculatura lingual. Esta mucosa oral está constituida por papilas de tres tipos. Las más numerosas, las papilas filiformes (Fig. 21A), entre las que se encuentran diseminadas las pequeñas y globulosas papilas fungiformes. De 12 a 20 grandes papilas circunvaladas suelen encontrarse entre las numerosas papilas filiformes rodeadas por un profundo surco. Estas papilas contienen la mayoría de los botones del gusto.

Los resultados de la IHC, mostraron la existencia de ADH4 en todas las papilas de la mucosa lingual (Fig. 21). Una intensa señal se localizó en las papilas filiformes, en concreto en la proyección de epitelio superficial fuertemente queratinizado. Las células en las que el corte atravesaba su núcleo (Fig. 21B y E, comparar con la tinción con hematoxilina mostrada en la micrografía de la Fig. 21A y D), aparecían con un círculo sin señal positiva, lo que evidencia la localización citosólica de ADH4. Por el contrario, el eje de tejido conectivo denso, que también forma este tipo de papila, no presentó una señal diferente a la del control correspondiente. La zona queratinizada del epitelio lingual (la más externa), no mostró presencia de proteína ADH4 (Fig. 21B y E). Las papilas fungiformes, por el contrario, presentan un epitelio fino delgado, no queratinizado, donde también se localizó ADH4, y un eje de tejido conectivo muy

Resultados

vascularizado, donde como en el caso anterior, no se detectó una señal diferente a la observada en las secciones control. Las papilas circunvaladas, las más grandes y las menos frecuentes de la lengua, presentaron una fuerte señal para ADH4 en su epitelio multiestratificado. El epitelio que tapiza la pared papilar del surco contiene una gran cantidad de botones gustativos (Fig. 21H). El tercio posterior de la lengua, posee una mucosa de superficie distinta, constituida por un epitelio escamoso estratificado relativamente liso, bajo el cual se encuentra una masa de tejido linfóide que contiene folículos linfoides típicos (Fig. 21G).

Finalmente, hay que destacar que se detectó cierta señal positiva, aunque tenue, en los haces de tejido muscular esquelético que forman el cuerpo de la lengua mientras que la señal fue muy tenue o inexistente en las glándulas serosas y glándulas mucosas (resultados no mostrados). Numerosos vasos sanguíneos que irrigan el órgano lingual también se tiñeron intensamente, tal y como muestra la micrografía de la Fig. 21H.

1.2.4.2 Esófago

El esófago es un fuerte tubo muscular que transporta los alimentos desde la orofaringe al estómago. La mucosa esofágica está profundamente plegada (esquema de la Fig. 20), disposición que permite una enorme distensión durante el paso del bolo alimenticio. La luz del esófago está revestida por un epitelio escamoso estratificado, grueso y protector, que en algunos animales que toman alimentos bastos, como las ratas y ratones, puede ser queratinizado. La lámina propia subyacente está relativamente condensada y contiene agregados linfoides diseminados. La submucosa está muy vascularizada, es relativamente laxa y contiene pequeñas glándulas mucosas que ayudan a la lubricación.

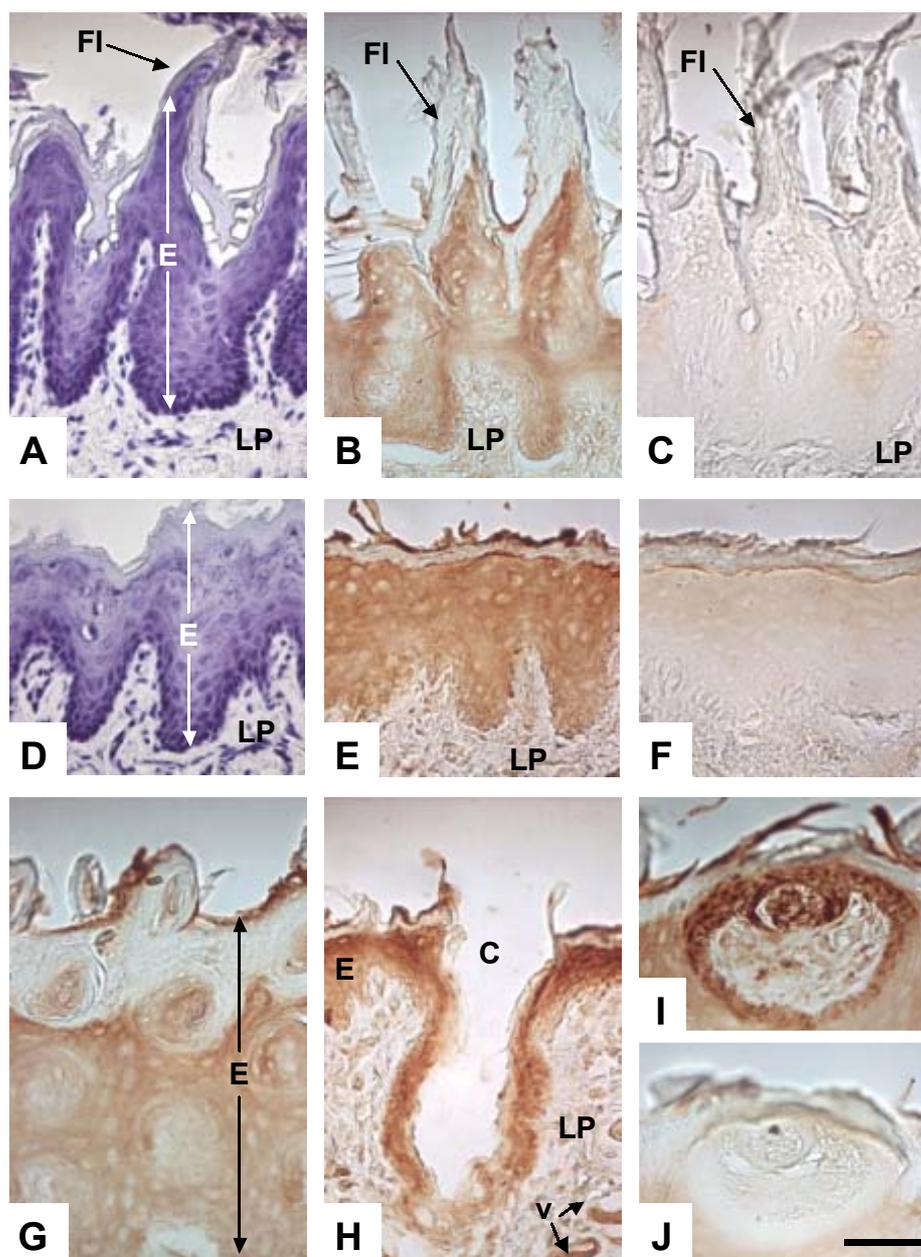


Figura 21. Distribución de la proteína ADH4 en la lengua de rata mediante IHC. Tinción con hematoxilina donde pueden distinguirse las diferentes estructuras histológicas (A y D). Detección inmunohistoquímica de ADH4 en las papilas linguales (B, E, G y H). Secciones control incubadas con el anticuerpo anti-ADH4 pre-adsorbido con 15 µg de proteína recombinante antigénica durante 1 h (C, F y J). Papilas filiformes (A, B y C); mucosa de la superficie lingual (D, E, y F); mucosa del tercio posterior de la lengua (G); epitelio estratificado que tapiza la pared papilar del surco que rodea a la papila circunvalada (H) y glándula de la mucosa lingual (I). C, papila circunvalada; E, epitelio multiestratificado queratinizado; FI, papila filiforme; LP, lámina propia; v, vasos sanguíneos. Barra de calibración (mostrada en J): 50 µm.