

Resultados

de revestimiento (Fig. 32A y B). La ISH (datos no mostrados) y la IHC (Fig. 32D) revelaron expresión de ADH4 en las células de la zona luminal de los pliegues que conforman la mucosa del colon en estado relajado, mientras que se observó una señal más tenue en la base de las glándulas. El mRNA y la proteína ADH4, colocalizaron en los mismos lugares de la mucosa colónica.

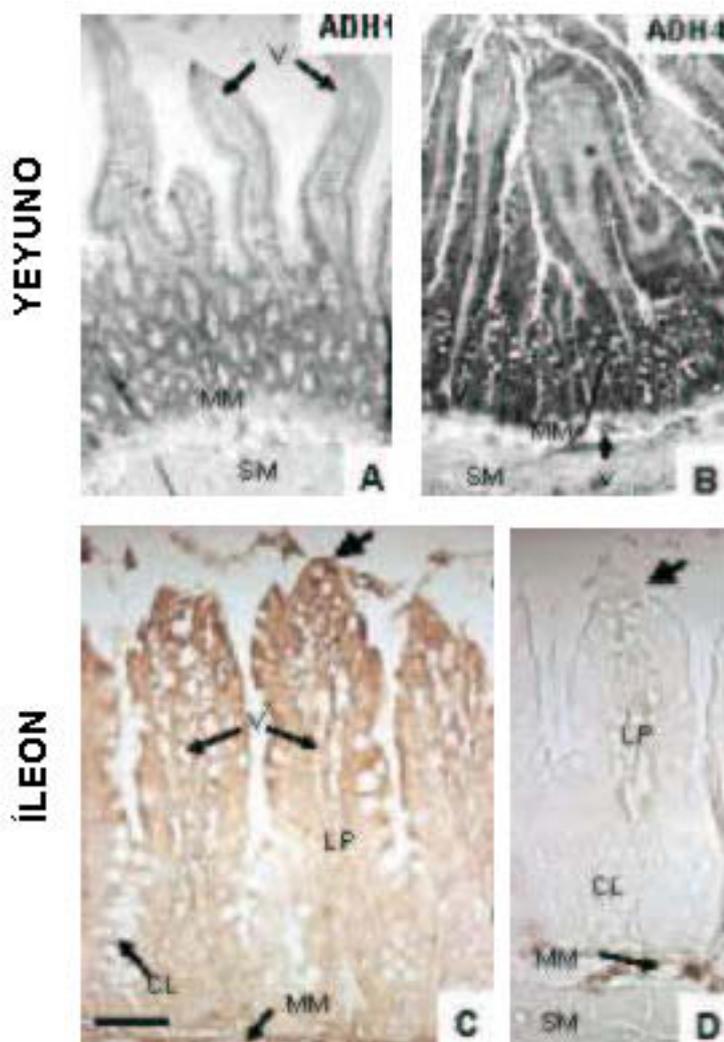


Figura 31. Distribución del mRNA de ADH1 y ADH4 en el yeyuno e íleon de rata. Detección del mRNA de ADH1 (A) y ADH4 (B) en la mucosa yeyunal. Inmunodetección de ADH4 en las vellosidades de la mucosa del íleon (C). Sección control en la que se ha omitido el anticuerpo primario (anti-ADH4) (D). CL, cripta de Lieberkühn; LP, lámina propia; MM, *muscularis mucosae*; SM, submucosa; V, vellosidad intestinal. Barras de calibración (mostrada en C): A-B, 200 μ m, C-D (mostrada en C): 50 μ m.

El recto es la porción terminal, corta y dilatada del intestino grueso, y como tal presenta una mucosa similar a la del resto del intestino grueso a excepción de una

mayor cantidad de células caliciformes. Las células positivas para ADH1, se detectaron, al igual que en el colon, en la base de las criptas de Lieberkühn (Fig. 33A y B). ADH4 se detectó en toda la mucosa rectal, de forma intensa e uniforme en las criptas (Fig. 33D y E). Por lo tanto, el mRNA de ambas clases colocaliza en la zona basal de la mucosa colorectal, esto es, en la base de las glándulas (Fig. 33A-B y D-E). La inmunotinción específica para ADH4 se localizó en toda la mucosa rectal con la misma ubicación que su mRNA (Fig. 33D, E y Fig.33G, H).

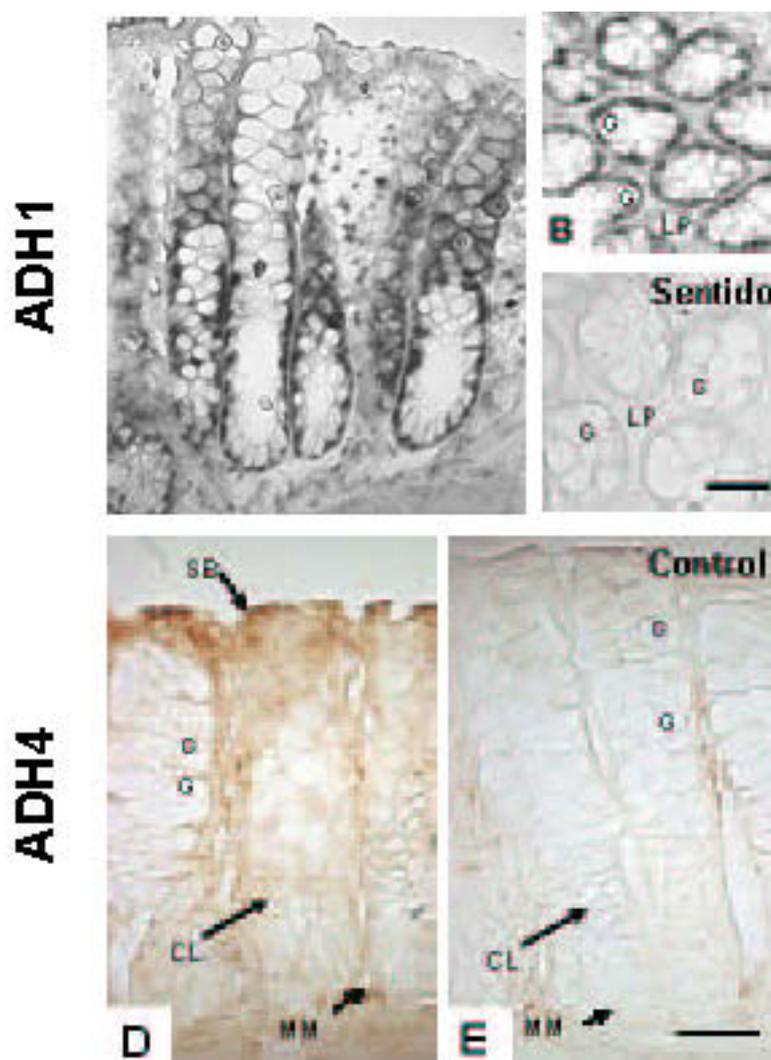


Figura 32. Distribución de ADH1 y de ADH4 en el colon de rata. Detección del mRNA de ADH1 en secciones longitudinales (A) y transversales (B) de las criptas de Lieberkühn. Sección hibridada con la sonda sentido para ADH1 (C). Inmunodetección de la proteína ADH4 mediante IHC (D). Sección control incubada con los anticuerpos pre-adsorbidos con 15 μ g de la proteína recombinante inmunogénica (E). CL, cripta de Lieberkühn; G, célula caliciforme; LP, lámina propia; MM, *muscularis mucosae*; SB, borde estriado de las células absorbentes. Barras de calibración: A-C (mostrada en C) y D-E (mostrada en E), 50 μ m.

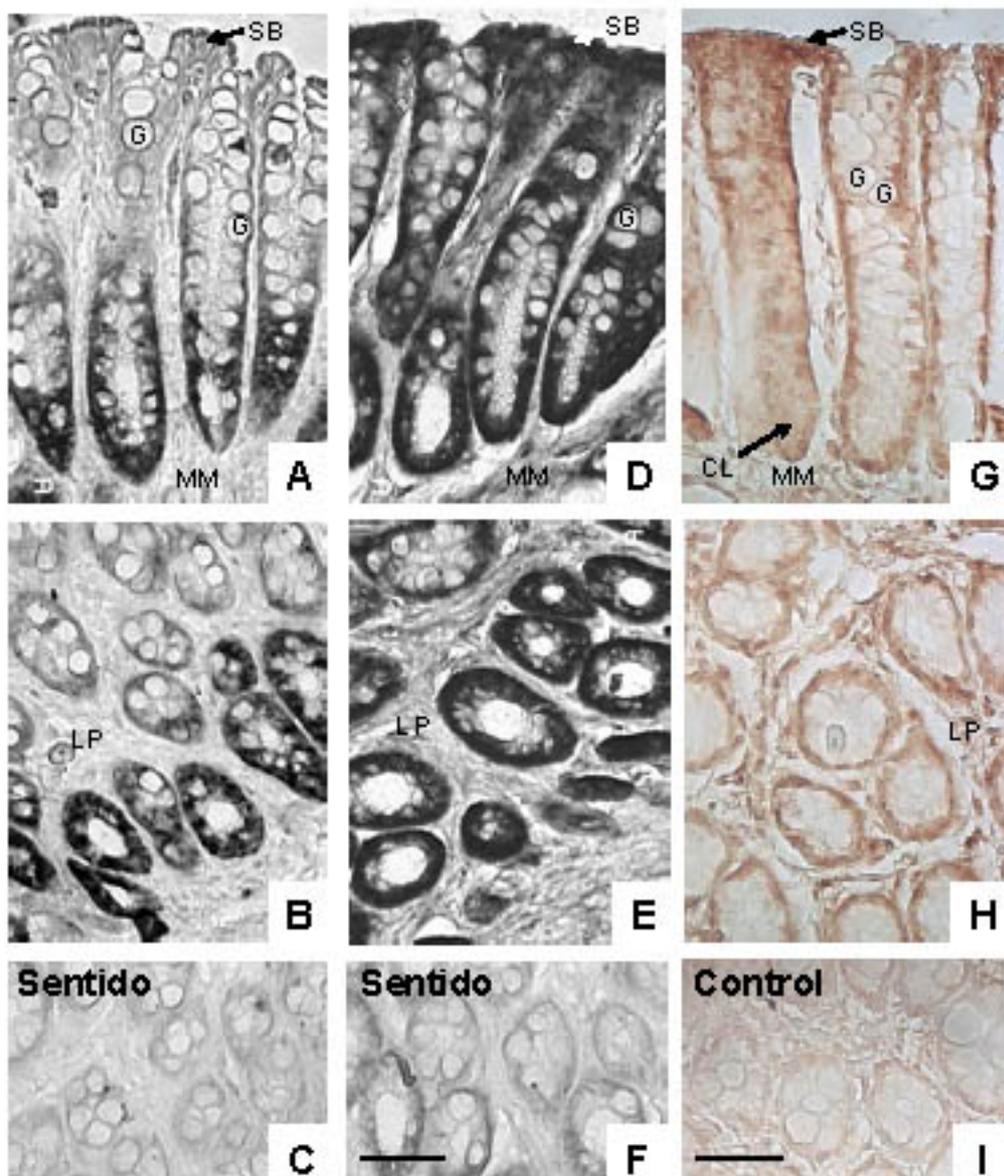


Figura 33. Distribución de ADH1 y ADH4 en el recto de rata. Detección del mRNA de ADH1(A y B) y ADH4 (D y E) mediante ISH. Secciones hibridadas con las sondas sentido para ADH1 (C) y ADH4 (F). Inmunodetección de la proteína ADH4 (G y H). Secciones control con los anticuerpos preincubados con la proteína recombinante inmunogénica ADH4 (I). Secciones longitudinales (A, D y G) donde se aprecian las glándulas tubulares (criptas de Lieberkühn) que se extienden desde la superficie luminal hasta la *muscularis mucosae*, y secciones transversales (B, E y H) de las criptas. CL, cripta de Lieberkühn; G, célula caliciforme; I, luz de la cripta; LP, lámina propia; MM, *muscularis mucosae*, SB, borde estriado. Barras de calibración: A-F (mostrada en F) y G-I (mostrada en I), 50 μ m.

1.4 Localización de la ADH en el SNC

1.3.1 Anatomía del SNC de rata

Previa descripción de los resultados de este trabajo, creo necesaria una breve introducción sobre la estructura básica del sistema nervioso con el fin de poder comprender con más facilidad las estructuras estudiadas. El sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico por los nervios espinales y craneales y por los ganglios periféricos. El SNC consta de tres divisiones principales, organizadas alrededor de las tres cámaras del tubo neural formadas en las primeras etapas de la vida embrionaria: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el romboencéfalo (Tabla 11).

Tabla 11. Subdivisiones anatómicas del cerebro

División principal	Ventrículo	Subdivisión	Principales estructuras
Prosencéfalo	Lateral	Telencéfalo	Corteza cerebral Ganglios basales Sistema límbico
	Tercero	Diencefalo	Tálamo Hipotálamo
Mesencéfalo	Acueducto cerebral	Mesencéfalo	Téctum Tegméntum
Romboencéfalo	Cuarto	Metencéfalo	Cerebelo Protuberancia
		Mielencéfalo	Bulbo raquídeo

El prosencéfalo, que rodea a los ventrículos laterales y al tercer ventrículo, consiste en el telencéfalo y el diencefalo. El telencéfalo contiene la corteza cerebral, el sistema límbico y los ganglios basales. La corteza cerebral se organiza en los lóbulos frontal, parietal, temporal y occipital. El surco central separa el lóbulo frontal, relacionado específicamente con los movimientos y su planificación, de los otros tres lóbulos, relacionados principalmente con la percepción y el aprendizaje. El sistema límbico, que incluye la corteza límbica, el hipocampo y la amígdala, está involucrado en las emociones, la motivación y el aprendizaje. Los ganglios basales participan en el control del movimiento. El diencefalo está formado por el tálamo, que intercambia información con la corteza cerebral, y el hipotálamo, que controla al sistema endocrino y modula conductas características de las diferentes especies. El mesencéfalo, que rodea el acueducto central, consiste en el téctum y el tegméntum. El téctum está involucrado en la audición y en el control de los reflejos visuales y de las reacciones ante estímulos en movimiento. El tegméntum contiene la formación reticular, que es

Resultados

una importante estructura en relación con el sueño, la vigilia y el movimiento; la sustancia gris periacueductal, que controla varias conductas típicas de cada especie; y el núcleo rojo y la sustancia negra, que forman parte del sistema motor.

El romboencéfalo, que rodea el cuarto ventrículo, contiene el cerebelo, la protuberancia y el bulbo raquídeo. El cerebelo juega un papel importante en la integración y coordinación de los movimientos. La protuberancia contiene algunos núcleos importantes para el sueño y la vigilia. El bulbo también está involucrado en el sueño y la vigilia, pero interviene, asimismo, en el control del movimiento y de funciones vitales como la actividad cardíaca, la respiración y la presión sanguínea. Finalmente, la médula espinal, la cual está formada en su parte externa por sustancia blanca, con axones que envían información ascendente o descendente; y por sustancia gris central que contiene los cuerpos neuronales.

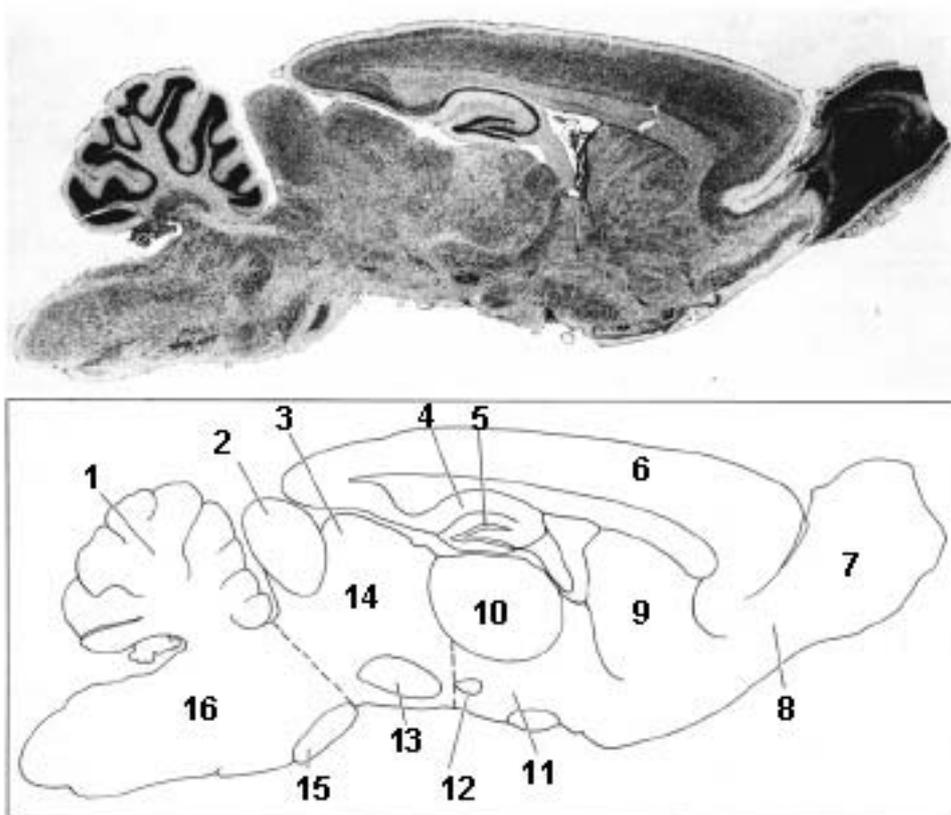


Figura 34. Sección sagital del cerebro de rata. Los números indican y localizan distintas estructuras anatómicas del cerebro de rata, algunas de las cuales han sido objeto de estudio en este trabajo. 1, Cerebelo; 2, colículo inferior; 3, colículo superior; 4, hipocampo; 5, circunvolución dentada; 6, neocortex; 7, bulbo olfatorio; 8, pedúnculo olfatorio; 9, estriado; 10, tálamo; 11, hipotálamo; 12, núcleo subtalámico; 13, sustancia negra; 14, mesencéfalo (cerebro medio); 15, protuberancia; 16, romboencéfalo (cerebro posterior). Reproducido de Nauta y Feirtag, 1979.

1.3.2 Detección de la ADH en homogeneizados de cerebro

El análisis espectrofotométrico de homogeneizados de cerebro entero o de regiones cerebrales concretas tales como el cerebelo, puente o protuberancia, hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral, estriado, bulbos olfatorios y sustancia blanca de la corteza cerebral, no detectó actividad etanol deshidrogenasa. La utilización de una elevada concentración de proteína de homogeneizado no mejoró la detección, e incluso aumentó considerablemente el ruido de fondo en las determinaciones.

El análisis de los homogeneizados de diferentes partes del cerebro de rata mediante electroforesis en gel de almidón y tinción por actividad enzimática con etanol o alcohol crotilico (2-buten-1-ol), mostró tan sólo la presencia de bandas con movilidad idéntica a ADH3 (FALDH) en todos los tejidos analizados (Fig.35).

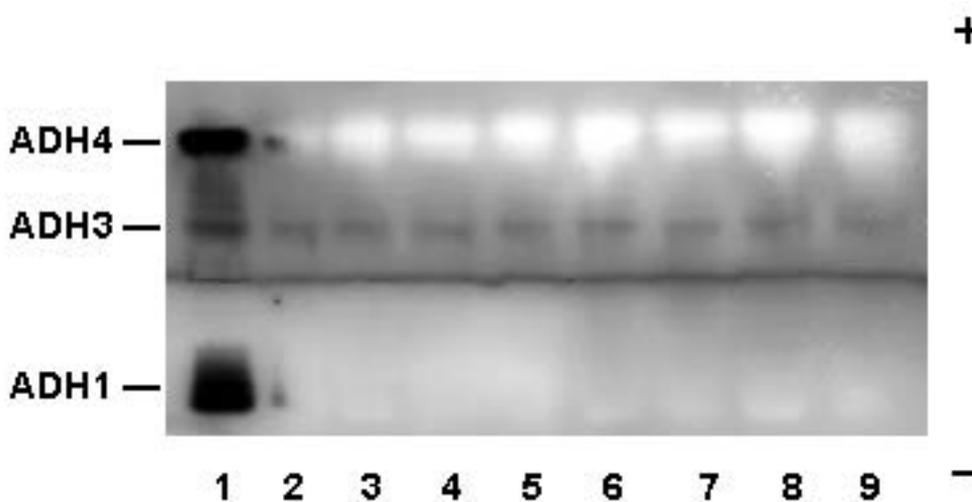


Figura 35. Electroforesis en gel de almidón de homogeneizados de tejido nervioso de rata adulta. La tinción por actividad del gel se realizó con alcohol crotilico 100 mM como sustrato. Carriles: 1, control (ADH1, ADH3 y ADH4 procedentes de una mezcla de hígado y estómago de rata); 2, hipotálamo; 3, hipocampo; 4, bulbo olfatorio; 5, sustancia blanca cerebral; 6, bulbo raquídeo; 7, estriado; 8, corteza cerebral y 9, cerebelo.

En algunas ocasiones, y sólo en ciertas regiones del SNC tales como en el hipocampo y bulbo olfatorio, se pudieron visualizar bandas de actividad ADH muy tenues, con una movilidad idéntica a ADH1 (Fig. 36, carriles 3 y 4).

1.3.3 Inmunodetección de la ADH en cerebro de rata

La inmunodetección de ADH4 en homogeneizados de diferentes regiones cerebrales 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 de estómago u ojo, en distintas regiones cerebrales. La

Resultados

intensidad de las bandas fue muy débil y fueron necesarios tiempos de incubación largos con la solución de detección, lo que aumentaba considerablemente la aparición de bandas inespecíficas debidas especialmente al anticuerpo secundario, tal como demostraron los controles correspondientes. Así, tras el ensayo de diferentes condiciones, los mejores resultados (Fig. 37) se obtuvieron con 30 μg de proteína de homogeneizado, una dilución 1:200 para el anticuerpo primario anti-ADH4 (inferior a la utilizada para otros tejidos) y 1:5000 para el anticuerpo secundario (superior a la recomendada por la casa comercial Bio-Rad).

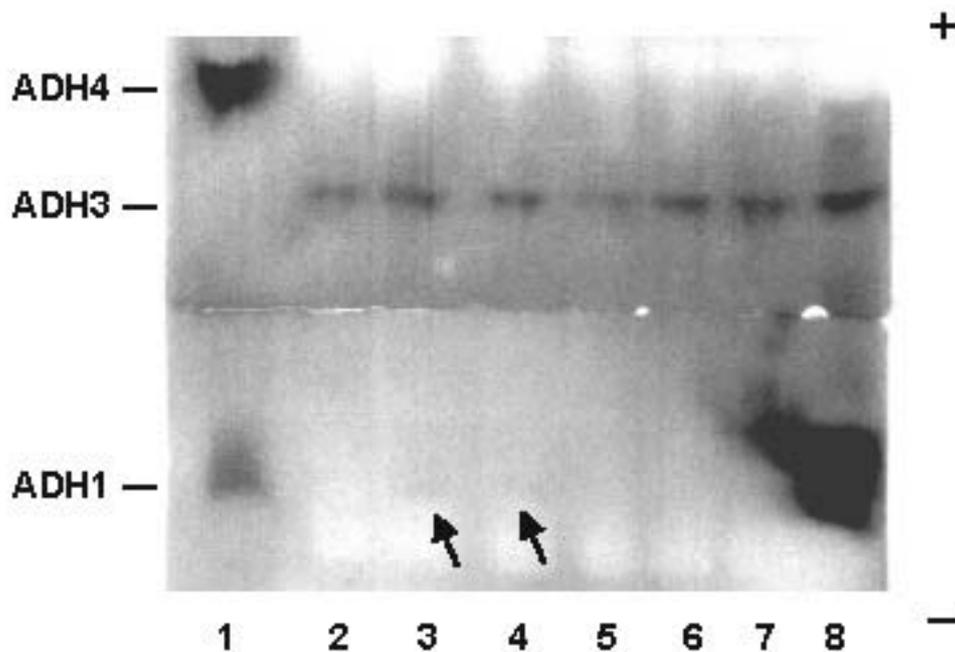


Figura 36. Electroforesis en gel de almidón de homogeneizados de tejido nervioso de rata adulta. La tinción por actividad del gel se realizó con alcohol crotilico 100 mM como sustrato. Carriles: 1, control (células H4IIEC3 de hepetocarcinoma de rata); 2, hipotálamo; 3, hipocampo; 4, bulbos olfatorios; 5, sustancia blanca cerebral; 6, puente; 7, estriado y 8, control (hígado).



Figura 37. Inmunodetección de ADH4 en cerebro de rata. Se analizaron 30 μg de proteína de homogeneizados de diferentes regiones de cerebro de rata por transferencia *Western*. La membrana fue incubada con anticuerpos contra ADH4. Carriles: 1, cerebelo; 2, bulbo raquídeo; 3, hipocampo; 4, protuberancia anular o puente; 5, corteza cerebral de los dos hemisferios. Se analizó también homogeneizado de ojo (E), como control positivo, y de hígado (L), como control negativo, de la presencia de ADH4.