

### 1.3.4 Detección de la expresión de ADH por hibridación *in situ*

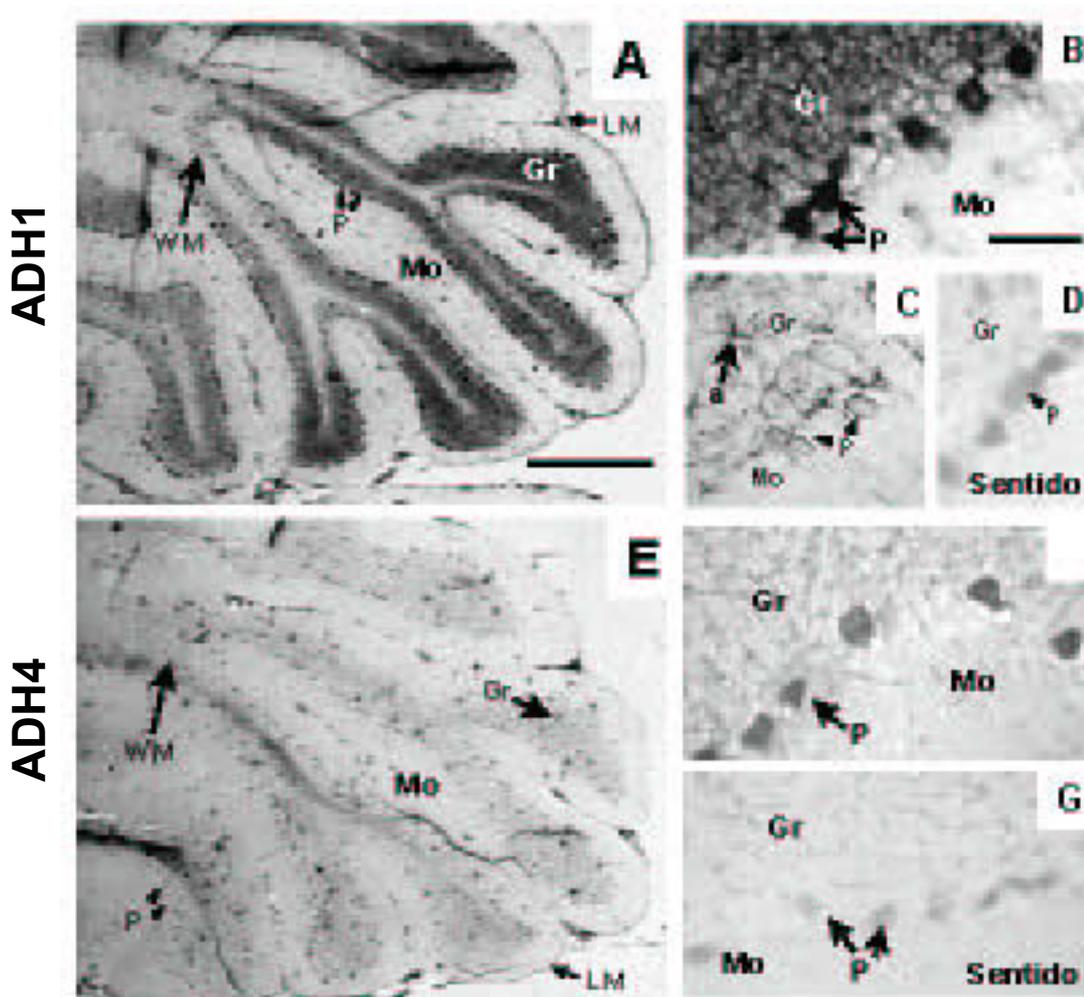
Se determinó el patrón de expresión, a nivel de mRNA, de los genes de ADH1 y ADH4 en regiones específicas del SNC. Para ello, diferentes secciones de tejido nervioso de rata se examinaron por ISH utilizando ribosondas específicas para las dos clases de ADH de rata. La hibridación con las ribosondas antisentido reveló la presencia de señal positiva en cerebelo, corteza cerebral y formación hipocampal. Además, los mRNAs de ambas clases de ADH se detectaron en el sistema vascular y ventricular asociado al tejido nervioso: leptomeninges, capa endotelial y plexos coroideos de los ventrículos y la microvasculatura. Numerosas regiones no mostraron expresión de ADH1 y ADH4, tales como los colículos inferior y superior, núcleo del rafe, núcleos talámicos, formación reticular y el cuerpo calloso (ver estructuras en Fig. 34).

#### 1.3.4.1 Expresión de la ADH en cerebelo

El cerebelo está formado por una corteza cerebelar de sustancia gris y una médula de sustancia blanca que contiene cuatro pares de núcleos. La corteza cerebelar forma una serie de circunvoluciones profundas o pliegues sostenidos por la médula central ramificada de sustancia blanca (estructura 1 de Fig. 34). La corteza, a más aumento, está formada por tres capas: una capa externa, la capa molecular, que contiene relativamente pocas células; una capa interna extremadamente rica en células, la capa celular granulosa, y una única capa intermedia de grandes neuronas denominadas células de Purkinje.

La ISH detectó la presencia del mRNA de ADH1 en la corteza pero no en la médula cerebelar (Fig. 38A). En la corteza, se localizó en la capa granulosa y en la monocapa de células de Purkinje, pero no en la capa molecular (Fig. 38A y B). En cambio, la hibridación con la ribosonda para ADH4 mostró no sólo señal positiva en la corteza sino también en ciertas zonas muy definidas de la sustancia blanca (Fig. 38E y F; Fig. 39). En la corteza cerebelar, ADH4 se detectó tan sólo en las células de Purkinje, coincidiendo con la expresión de ADH1, pero no se expresó ni en la capa granulosa ni en la molecular (Fig. 38F, comparar con Fig. 38B). Como se ha comentado anteriormente, también se detectó una intensa señal positiva para ADH4 en una capa bien definida en la médula cerebelar de los lóbulos 4 y 6 limitada por la fisura primaria, que pudo observarse claramente en los cortes transversales del cerebelo de rata. La señal se detectó en la zona media (lo que se conoce como *vermis* cerebelar) y en la intermedia pero no en las zonas laterales (Fig. 38E y Fig. 39A, B y D, comparar con la lámina 113 de Paxinos y Watson, 1986). La detección inmunocitoquímica de GFAP, en las secciones de cerebelo, mostró que la señal de ISH localizada en la sustancia blanca, no se encontraba en los astrocitos (Fig. 39E). Este hecho sugiere que esta zona con ADH4 podría relacionarse con las fibras comisurales (las fibras colaterales)

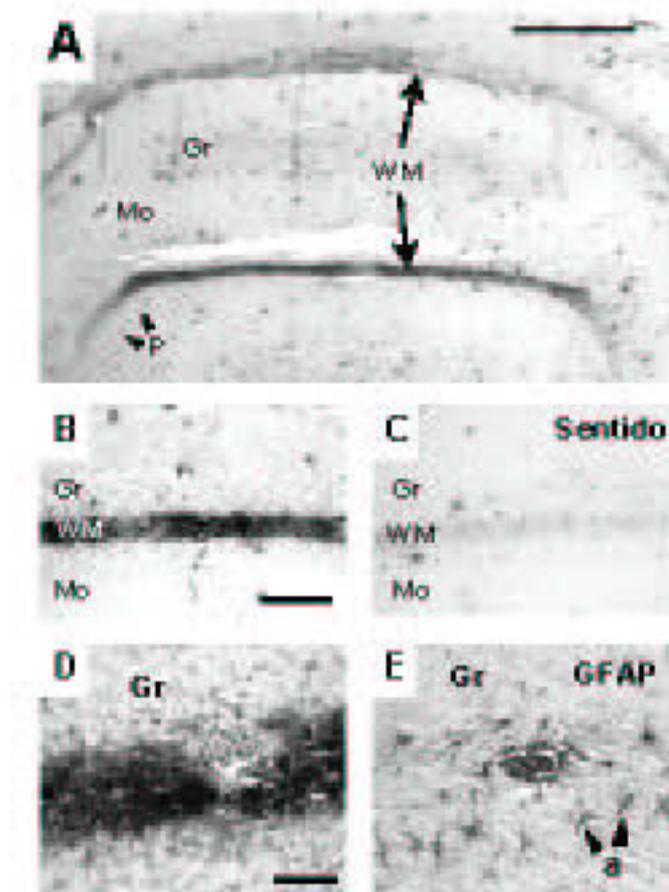
que discurren de un hemisferio a otro del cerebelo y que permiten la integración de la señal por parte del cerebelo.



**Figura 38. Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en secciones de cerebelo de rata adulta mediante ISH.** Se detectó ADH1 en la capa granulosa y en las células de Purkinje de la corteza cerebelar (A y B), mientras que ADH4 sólo apareció en las células de Purkinje (E y F). Identificación de los astrocitos en la corteza cerebelar mediante ICC para GFAP (C). Las secciones control hibridadas con sondas sentido para ADH1 (D) y ADH4 (G) no mostraron señal. a, astrocito; Gr, capa granulosa; LM, leptomeninges; Mo, capa molecular; P, célula de Purkinje; WM, sustancia blanca. Barras de calibración: A y E (mostrada en A), 800  $\mu$ m, B-D, F y G (mostrada en B), 50  $\mu$ m.

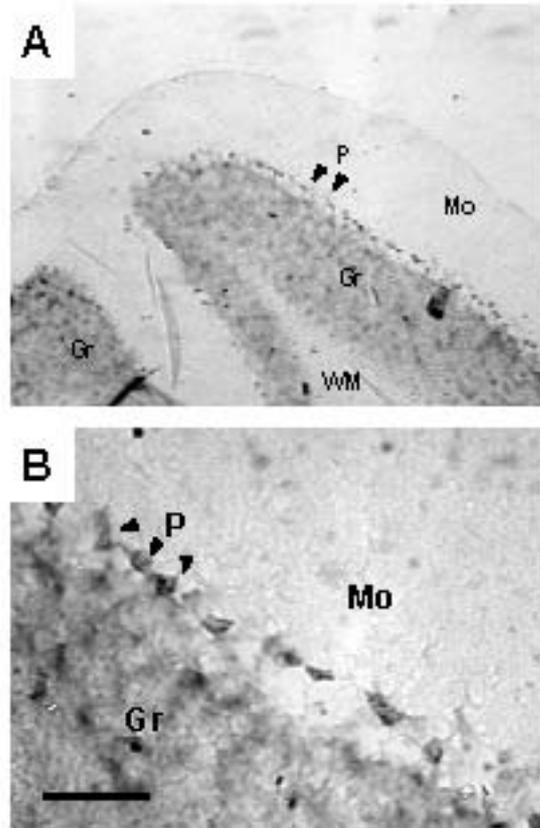
En el cerebelo de ratón, el análisis mediante ISH con la ribosonda antisentido específica para ADH4 reveló la presencia del mRNA de ADH4 tanto en la capa granulosa como en las células de Purkinje (Fig. 40), en contraste con el cerebelo de

rata en que la expresión de ADH4 se detectó exclusivamente en las células de Purkinje (Fig. 38E y F).



**Figura 39. Localización del mRNA de ADH4 en la medula cerebelar mediante ISH.** Presencia de ADH4 en una capa definida de la médula cerebelar (**A**, **B** y **D**). Sección control hibridada con la sonda sentido ADH4 (**C**). Identificación de los astrocitos en la sustancia blanca por ICC para GFAP (**E**). a, astrocito; Gr, capa granulosa, Mo, capa molecular, P, célula de Purkinje, WM, sustancia blanca. Barras de calibración: A, 200  $\mu\text{m}$ ; B y C (mostrada en B), 100  $\mu\text{m}$ ; D y E, (mostrada en D), 50  $\mu\text{m}$ .

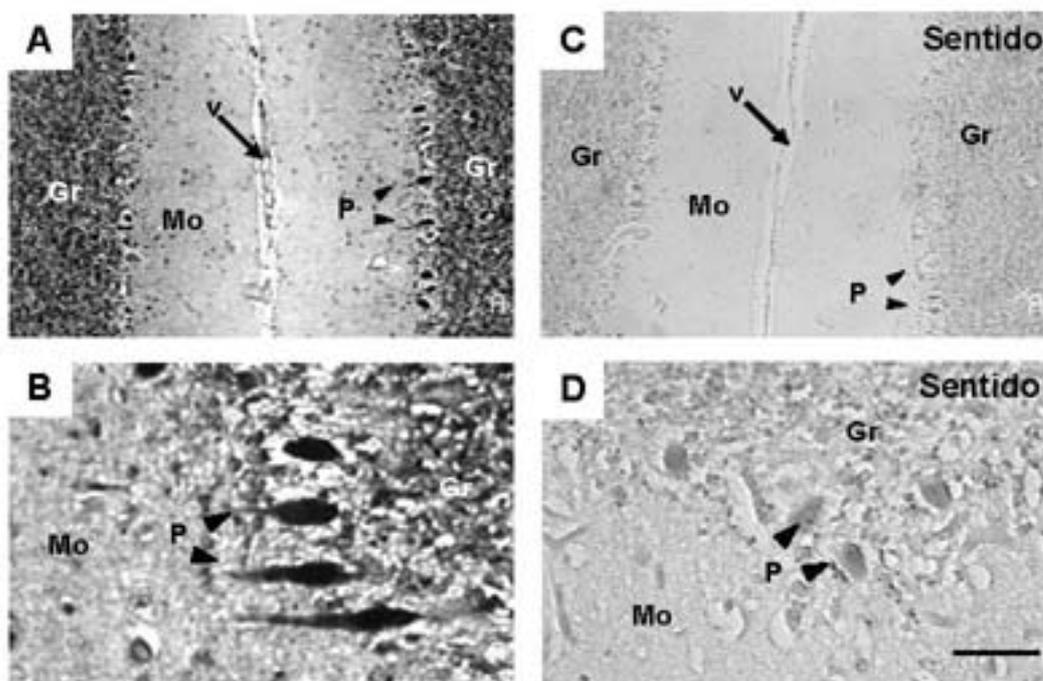
En el cerebelo humano, el análisis mediante ISH con una ribosonda antisentido específica para ADH4 humana mostró que el mRNA de ADH4 se encontraba en la corteza cerebelar pero no en la médula cerebelar, al menos en las regiones analizadas (Fig. 41). En la corteza, la señal se localizó en la capa granulosa (a diferencia de lo observado en rata) y en la capa de células de Purkinje, pero no en la capa externa molecular (Fig. 41A y B). Al igual que en el SNC de rata, se detectó señal positiva y específica para ADH4 en el endotelio vascular de los capilares sanguíneos que nutren el cerebelo (Fig. 41A y 42A). La hibridación con la sonda sentido no mostró señal específica (Fig. 41C y 42B).



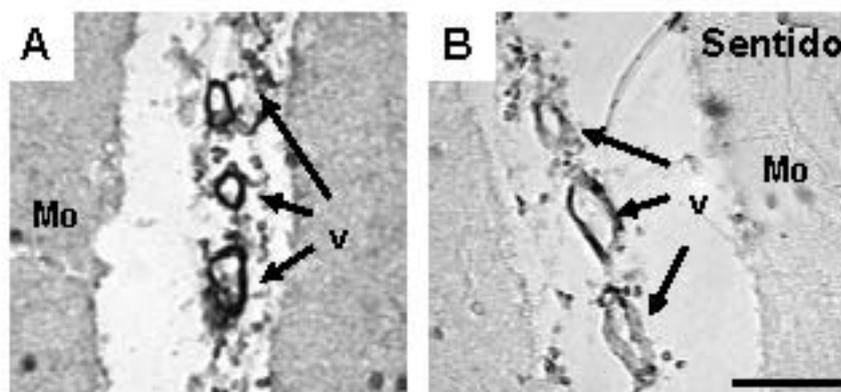
**Figura 40. Localización del mRNA de ADH4 en secciones de cerebelo de ratón adulto mediante ISH.** ADH4 se detectó en la capa granulosa y en las células de Purkinje de la corteza cerebelar (A y B). Gr, capa granulosa, Mo, capa molecular, P, célula de Purkinje, WM, sustancia blanca. Barra de calibración (mostrada en B): A, 100  $\mu\text{m}$ ; B, 50  $\mu\text{m}$ .

#### 1.3.4.2 Expresión de la ADH en la formación hipocampal

La formación hipocampal es una región especializada de la corteza límbica, localizada en el lóbulo temporal (estructuras 4 y 5 de Fig. 34). El hecho de estar replegada en una dimensión y luego curvada en otra, hace que tenga una forma tridimensional compleja, haciendo difícil su representación sobre el papel. La formación hipocampal incluye la corteza entorrinal, las tres subdivisiones del complejo subicular, el propio hipocampo y la circunvolución dentada. El hipocampo también se denomina asta de Ammon o, en latín *cornu ammonis*, lo que explica por qué sus principales subdivisiones reciben el nombre de CA1, CA2, CA3 en la rata y una más, CA4, en humanos. En la Fig. 43A, se indica la posición relativa de la formación hipocampal de ambos hemisferios del SNC de la rata.



**Figura 41. Localización del mRNA de ADH4 en secciones de cerebelo humano mediante ISH.** Detección de ADH4 en la capa granulosa y en las células de Purkinje de la corteza cerebelar (A y B). Secciones control hibridadas con la sonda sentido para ADH4 humana (C y D). Gr, capa granulosa, Mo, capa molecular, P, célula de Purkinje, WM, sustancia blanca; v, capilares sanguíneos. Barras de calibración (mostrada en D): A y C, 200  $\mu$ m; B y D, 50  $\mu$ m.



**Figura 42. Localización del mRNA de ADH4 en los vasos de cerebelo humano mediante ISH.** Detección de ADH4 en el endotelio de los capilares sanguíneos asociados al cerebelo (A). Sección control hibridada con la sonda sentido para ADH4 humana (B). Mo, capa molecular, v, vasos sanguíneos. Barra de calibración (mostrada en B): 50  $\mu$ m.