

(Fig. 50A). Esta heterogeneidad en la señal de ISH podría relacionarse con un diferente contenido de mRNA para la ADH entre las células de Purkinje. Esta observación está de acuerdo con trabajos previos en los que se muestra por IHC una distribución heterogénea del contenido de proteína ADH en la población de células de Purkinje del cerebelo de rata (Kerr y col., 1989) y humano (Bühler y col., 1983). Es interesante relacionar este hecho con la heterogénea distribución también descrita para la ALDH en estas neuronas del cerebelo de rata (Zimatkin y col., 1992). Cabe destacar que, frente a la intoxicación por etanol, las células de Purkinje del cerebelo de ratón reaccionan de forma distinta y con respuestas electrofisiológicas diferentes entre sí (Basile y col., 1983), lo que podría relacionarse con el contenido variable de ADH y ALDH en dichas células.

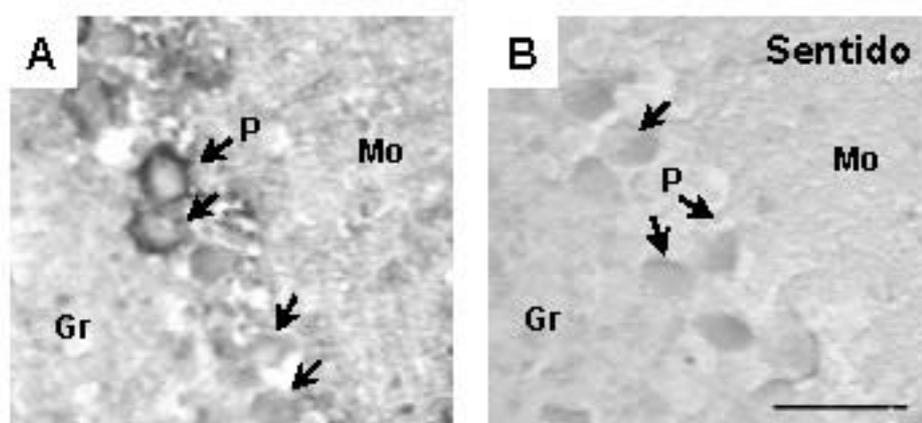


Figura 50. Detección del mRNA de ADH4 en las células de Purkinje del cerebelo mediante ISH. Expresión heterogénea de ADH4 en las células de Purkinje del cerebelo de rata (A), y el correspondiente control con la sonda sentido (B). Las flechas indican algunas células de Purkinje. Gr, capa granulosa del cerebelo, Mo, capa molecular, P, célula de Purkinje. Barra de calibración (mostrada en B): 50 μ m.

1.3.4.5 Expresión de ADH en meninges, ventrículos y vasculatura asociada al SNC

El cerebro y la médula espinal están cubiertos por unas láminas protectoras denominadas meninges, las cuales constan de tres capas o membranas: la duramadre, la más externa, gruesa y flexible; la membrana aracnoides, la capa intermedia, blanda y esponjosa; y la piamadre que está íntimamente unida a la superficie del cerebro y médula espinal, y recubre todas las circunvoluciones. La piamadre y la aracnoides son denominadas leptomeninges, y contienen un gran número de vasos sanguíneos por los que corre la sangre que nutre al tejido nervioso. El mRNA de ambas clases, ADH1 y ADH4, se localizó en las leptomeninges (Fig. 38A y E; 46A y B; 48A y B; 51A y C).

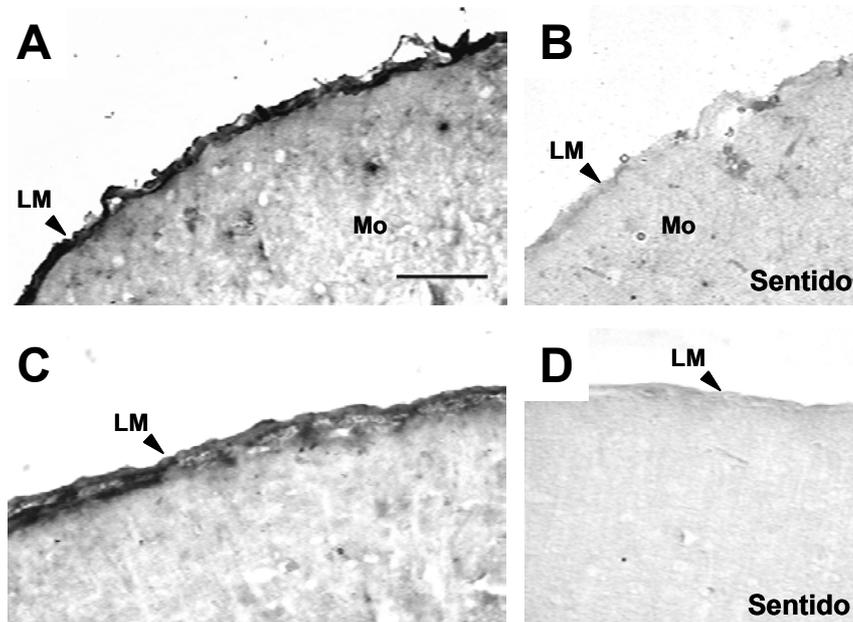


Figura 51. Detección de la expresión de ADH4 en las leptomeninges que recubren el SNC mediante ISH. El mRNA de la ADH4 se encontró en las meninges que recubren el cerebelo (A) y la corteza cerebral (C). La hibridación de las correspondientes secciones control de cerebelo (B) y corteza cerebral (D) con la sonda sentido de la ADH4 no mostró señal colorimétrica. LM, leptomeninges; Mo, capa molecular del cerebelo. Barra de calibración (mostrada en A): 100 μ m.

El cerebro contiene una serie de cámaras huecas e interconectadas, los ventrículos, repletos de líquido cefalorraquídeo. La cavidad ventricular está dilatada en cuatro regiones: los dos ventrículos laterales en los hemisferios cerebrales, el tercer ventrículo en el diencéfalo, y el cuarto ventrículo en el romboencéfalo entre el cerebelo, la protuberancia y el bulbo raquídeo. Los plexos coroideos se desarrollan en estos ventrículos y la mayor parte del líquido cefalorraquídeo se produce en los vasos sanguíneos de estos plexos, aunque también se genera en las meninges y en la sustancia cerebral. En los plexos coroideos y en la capa endimocitaria que tapiza las paredes de los tercer y cuarto ventrículos, se observó una intensa señal para ADH1 (no mostrado) y ADH4 (Fig. 52).

Finalmente, tanto las arterias y arteriolas que penetran en el SNC rodeadas de piamadre (Fig. 53A y B), como los capilares que penetran en el parénquima nervioso sin ella, presentaron mRNA de ADH4 y ADH1. En los capilares, la señal estuvo confinada al endotelio que los constituye (Fig. 41A; 42A; 46A-D; 47B; 48A-C; 53C y D).

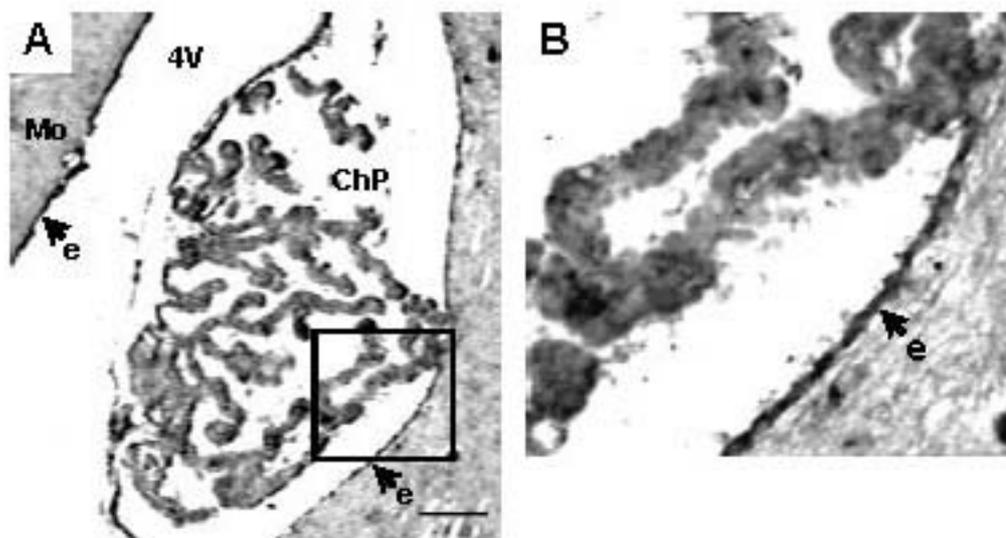


Figura 52. Localización del mRNA de ADH4 en el sistema ventricular mediante ISH. Señal específica para ADH4 en el plexo coroideo y en los ependimocitos de las paredes del cuarto ventrículo (A). El área de recuadro se muestra de forma más ampliada en (B). ChP, plexos coroideos; e, capa ependimaria; Mo, capa molecular del cerebelo; 4V, cuarto ventrículo. Barra de calibración (mostrada en A): 200 μm .

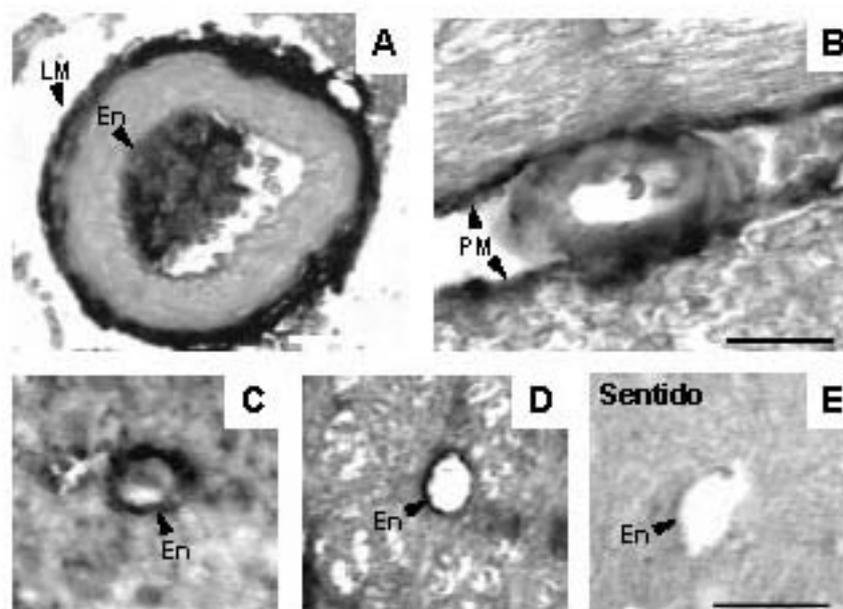


Figura 53. Localización del mRNA de ADH4 en el sistema vascular del SNC mediante ISH. ADH4 se detectó en la piamadre que recubre las arterias y vasos (A y B) y en el endotelio de los capilares asociados a la sustancia cerebral (C y D). Sección control hibridada con la sonda sentido para ADH4 (E). En, endotelio vascular; LM, leptomeninges; PM, piamadre. Barras de calibración: A y C-E (mostrada en E), 50 μm ; B, 20 μm .

1.3.5 Localización de la expresión de ADH4 en cerebelo de ratón.

Mediante tinción histoquímica, se determinó la actividad ADH (principalmente debida a ADH4) en secciones de cerebelo de ratón con etanol 500 mM como sustrato y en presencia del inhibidor 4-metilpirazol en la mezcla de reacción (Fig. 54A, C y E), en comparación con secciones control incubadas en idénticas condiciones en ausencia de sustrato (Fig. 54B, D y F). La reacción catalizada por la ADH se visualizó por el desarrollo de coloración azul debida a los precipitados de formazán. Se detectó actividad ADH en la capa granulosa y en la monocapa de células de Purkinje de la corteza cerebelar, así como en los plexos coroideos y en la capa ependimocitaria del cuarto ventrículo asociado al cerebelo (Fig. 54A, C y E).

Estos resultados demostraban que el mRNA de ADH4 es traducido a proteína activa en estas regiones del cerebelo. En las condiciones que se realizó la tinción resultó difícil determinar la contribución exacta de cada clase de ADH al total de actividad. Sin embargo, en presencia de 4-metilpirazol 2 mM se inhibió la contribución de ADH1, y además, a pH 7,5 en el que se realizó la tinción, la actividad de ADH3 es casi inexistente (Julià y col., 1987b), por lo que la actividad observada fue debida mayoritariamente a ADH4.

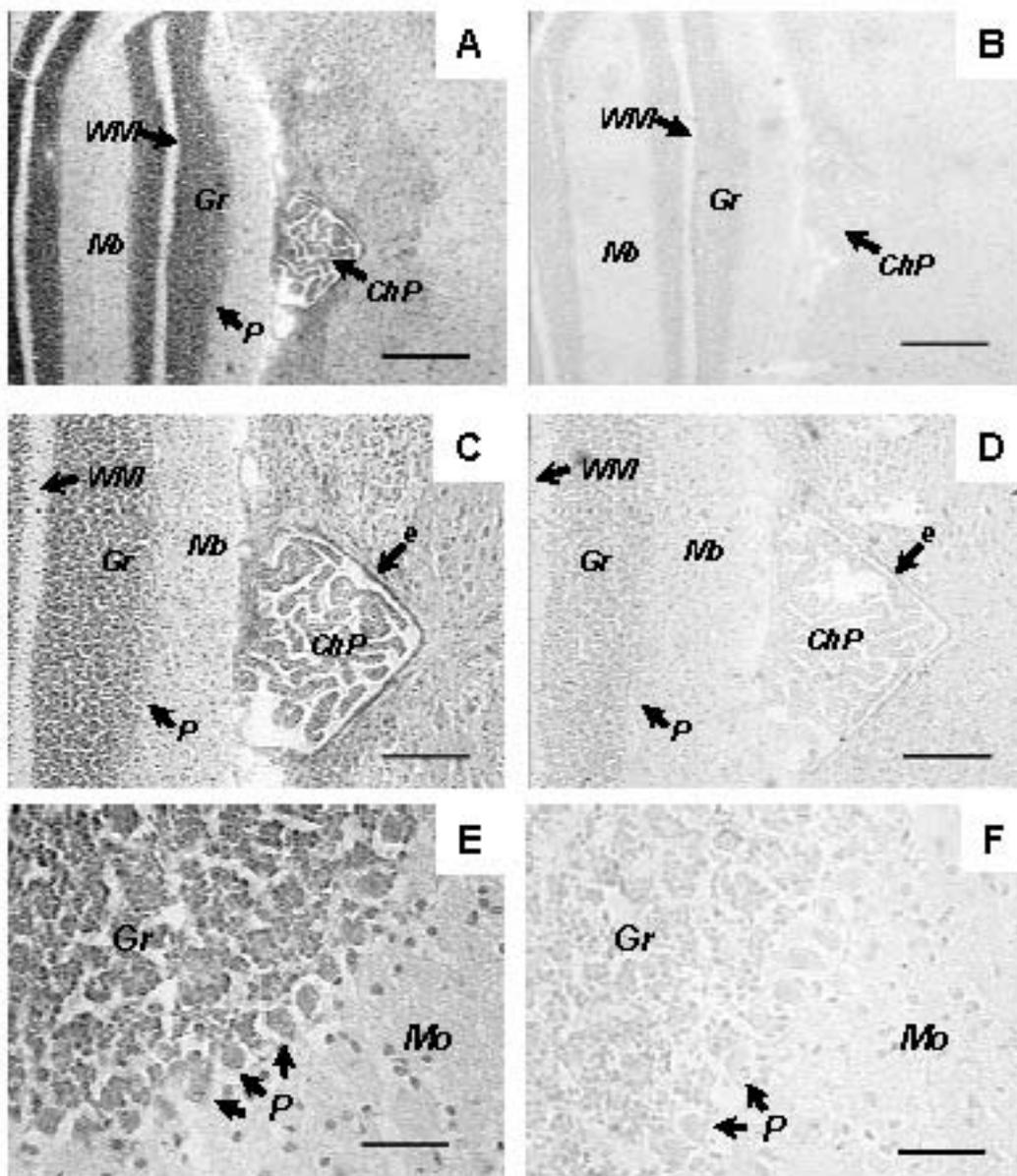


Figura 54. Detección de la actividad ADH en el cerebelo de ratón mediante tinción histoquímica. Tinción por actividad con etanol 500 mM como sustrato, en presencia de 4-metilpirazol 2 mM (A, C y E) y los correspondientes controles incubados en solución de tinción en ausencia de sustrato (B, D y F). ChP, plexos coroideos; e, capa endimaria; Gr, capa granulosa, Mo, capa molecular, P, célula de Purkinje, WM, sustancia blanca. Barras de calibración: A y B, 800 μ m; C y D, 400 μ m ; E y F, 100 μ m.

Tabla 12. Localización del mRNA de ADH1 y ADH4 en el SNC de rata mediante ISH.

REGIÓN	ÁREA	ADH1	ADH4
Cerebelo	Corteza	+	-
	Capa granulosa interna	+	+
	Células de Purkinje	-	-
	Capa molecular externa		
	Médula (sustancia blanca)	-	+
Colículo inferior		-	-
Colículo superior		-	-
Núcleo del rafe		-	-
Formación hipocampal	Hipocampo (regiones CA)	+	+
	Circunvolución dentada	+	+
	Hilio	+	+
	Subículo	+	+
Tálamo		-	-
Corteza cerebral	Frontal	-	+
	Parietal	+	+
	Temporal	+	+
	Occipital	+	+
	Piriforme	-	+
Sistema ventricular y vascular	Leptomeninges	+	+
	Epitelio endimario	+	+
	Plexos coroideos	+	+
	Arterias, arteriolas y capilares	+	+

1.4 Localización de la ADH en ojo de rata

El ojo, órgano especializado en la fotorrecepción, está formado por tres capas básicas: la externa o capa corneoescleral, la intermedia o capa uveal y la capa interna o capa retiniana. La capa esclerocorneal es una cápsula fibroelástica dura que sostiene el ojo. Las cinco sextas partes posteriores corresponden a la esclerótica, y la sexta parte anterior, a la córnea, que es la parte gruesa y transparente encargada de la refracción del ojo y del enfoque de las imágenes sobre la retina. La capa uveal, es una capa ricamente vascularizada formada por tres componentes: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides descansa entre la esclerótica y la retina en las cinco sextas partes