

Se investigaron también secciones de nervio óptico humano mediante ISH utilizando una ribsonda antisentido específica para ADH4 humana. En el nervio óptico humano, el mRNA de ADH4 se detectó en toda la sección con elevada intensidad y de forma generalizada (Fig. 59). La señal se localizó principalmente en la vaina interna de piamadre que rodea el nervio óptico (Fig. 59A y B), en los numerosos septos de piamadre que rodean los fascículos de fibras nerviosas y en el endotelio vascular de las venas y arteria central de la retina así como el de los numerosos capilares localizados entre los haces de fibras y que nutren el nervio óptico (Fig. 59A).

Tabla 13. Distribución de ADH4 en los tejidos oculares

Capa celular	Presencia de ADH4
ESCLERÓTICA	–
COROIDES	+
CÓRNEA	+
CUERPO CILIAR	+
RETINA	
Epitelio pigmentado	+
Capa de conos y bastones	–
Membrana limitante interna	–
Capa nuclear externa	+
Capa plexiforme externa	–
Capa de células ganglionares	+
Capa de fibras nerviosas	–
Membrana limitante interna	–
NERVIO ÓPTICO	+

2 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ADH EN RESPUESTA A ÁCIDO RETINOICO

Se investigó la presencia de actividad ADH y el patrón de expresión enzimático en la línea H4IIEC3, mediante ensayos de actividad y electroforesis en gel de almidón. La línea H4IIEC3 de hepatocarcinoma de rata, derivada de hepatoma de rata de Reuber, se conocía como una línea de células poco desdiferenciadas y que, por tanto, expresaban actividad ADH (Crettaz y Kahn, 1983), aunque no se había determinado la clase de ADH expresada. Por otro lado, se había descrito anteriormente que en determinados hepatomas de rata se expresaba una forma de ADH típica de estómago, no presente en hígado sano (Cederbaum y col., 1975; Plapp y col., 1987).

2.1 Morfología y crecimiento de las células H4IIEC3

En primer lugar, se inició la puesta a punto de las técnicas de cultivo de células animales y se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento de las células H4IIEC3 de hepatocarcinoma de rata. El mantenimiento y crecimiento óptimos se obtuvieron en medio DME F-12 suplementado con un 5% (v/v) de suero bovino fetal.

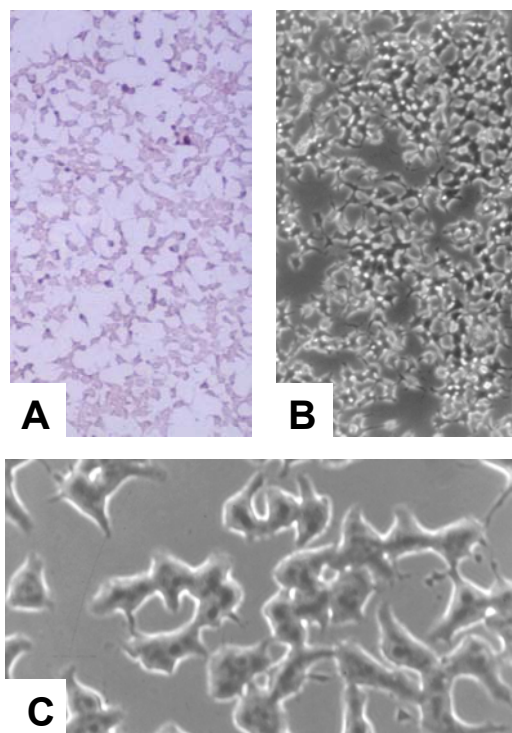


Figura 60. Células H4IIEC3 de hepatocarcinoma de rata. Las células se cultivaron en frascos y se realizó una tinción con hematoxilina tras el tercer día de crecimiento exponencial. Micrografías en campo claro (A) y en contraste de fases (B y C). Magnificación original: A y B, 100x; C, 400x.

La morfología de las células observada en los cultivos se correspondió a la descrita en la bibliografía: crecimiento en monocapa, con células estrelladas una vez adheridas al sustrato de los frascos o placas de cultivo, con núcleo grande y varios nucleolos, y citoplasma situado de manera asimétrica (Fig. 60). El estudio de la fase de crecimiento exponencial de las células se realizó a partir de varias densidades celulares iniciales, resultando óptima la de 10^5 células/ml. Inóculos menos concentrados aumentaron notablemente la duración del periodo de eclipse, siendo el crecimiento lento o inexistente en las primeras horas, e incluso observándose cierta disminución de la viabilidad celular.

Los resultados mostraron que las células H4IIEC3 crecían exponencialmente a partir de $0,5-1 \times 10^6$ células/ml. En la fase de crecimiento exponencial, el tiempo de

duplicación fue de aproximadamente 12-15 h, siendo necesarios de 4-5 días para alcanzar la confluencia.

2.2 Análisis electroforético del patrón ADH en las células H4IIEC3

Los homogeneizados celulares analizados mediante electroforesis en gel de almidón y tinción por actividad ADH con etanol o alcohol crotilico (2-buten-1-ol) como sustrato, mostraron tres grupos de bandas con movilidades idénticas a ADH1 y ADH3 de hígado de rata, y ADH4 de estómago de rata (Fig. 61). ADH1 de las células mostró el patrón de 3-4 bandas catódicas habituales en las muestras hepáticas de rata. ADH3 y ADH4, se detectaron cada una como una banda de movilidad anódica. La banda correspondiente a ADH3, presente en todos los tejidos analizados, no se visualizó en el gel teñido con etanol como sustrato (Fig. 61A), y solo ligeramente en el gel teñido con 2-buten-1-ol (Fig. 61B). En cambio, la tinción con formaldehído y glutatión tan sólo reveló la banda correspondiente a ADH3 (Fig. 61C).

El análisis por isoelectroenfoque y tinción por actividad proporcionó bandas de puntos isoeléctricos 8,3, 6,3 y 5,1, típicos de ADH1, ADH3 y ADH4, respectivamente (datos no mostrados).

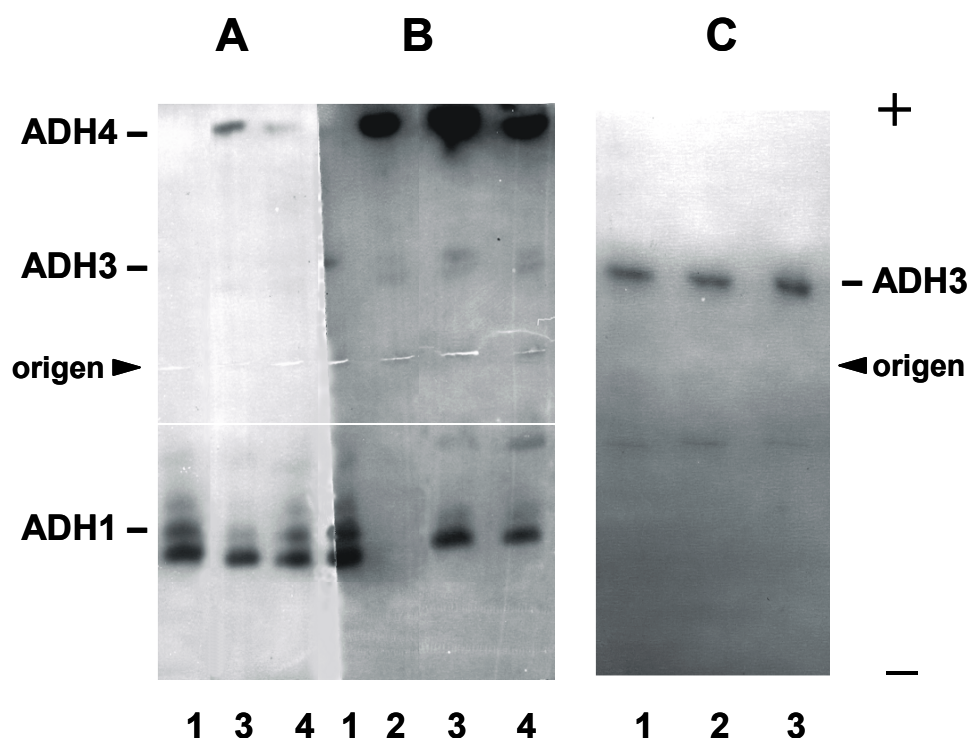


Figura 61. Electroforesis en gel de almidón, a pH 7,6, de homogeneizados de células H4IIEC3 y tejidos de rata. La tinción se realizó con etanol 200 mM (A), 2-buten-1-ol 100 mM (B), o tinción con formaldehído 4,8 mM y glutatión 1 mM (C). Se analizaron homogeneizados de hígado (1) y estómago (2) de rata, y también células H4IIEC3, incubadas en presencia de medio de crecimiento suplementado con FBS 5% (v/v) (3) o NCS 0,5% (v/v) (4).