

Procedimientos Inmunocitoquímicos para Estudiar la Distribución y la Participación en la Defensa de Péptidos Antimicrobianos

M. Muñoz¹, E. Bachère², G. Mitta³, A. Desmons⁴, F. Vandebulcke⁴

¹ Laboratorio de Biología. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar
Escuela Superior Politécnica del Litoral. Km. 30.5 Vía Perimetral, contiguo a Cdla. Santa. Cecilia., 09-015863,
Guayaquil - Ecuador
mmunoz@espol.edu.ec

² IFREMER / CNRS / Université de Montpellier 2
UMR 5098, "Défense et Résistance chez les Invertébrés Marins", CC 80, 2 place Eugène Bataillon - 34095
Montpellier, France.

³ Parasitologie fonctionnelle et Evolutive, UMR CNRS 5555
Université de Perpignan, France.

⁴ Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie. EA 3570. Université de Lille 1. Cité scientifique,
Batiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France..

Resumen

El presente artículo describe adaptaciones y principios básicos para la realización de análisis inmunocitoquímicos para la detección de péptidos antimicrobianos tanto de camarones como de mejillones. Estos análisis inmunocitoquímicos, no solamente describen en forma estática la ubicación de estos péptidos, si no que permitir tener una comprensión funcional de los fenómenos ligados a localización y distribución de estos efectores. Los análisis aquí descritos son variados y comienzan con la descripción de la detección los efectores en cortes histológicos provenientes de bloques de parafina y el uso de la microscopía confocal. Además, este artículo describe también protocolos y pone de manifiesto ciertos detalles técnicos de la detección inmune de los efectores antes o después de la inclusión en la resina asociados a la microscopía electrónica tanto de células como de pequeños piezas de tejidos disectados.

Palabras claves: *Inmunocitoquímica, péptidos antimicrobianos, microscopia confocal y microscopia electrónica de transmisión.*

Abstract

This article describe adaptations and basic principles for the immunocytochemical analyses in order to detect antimicrobial peptides in shrimps and mussels. These immunocytochemical analyses, not only describe in static way the localization of these peptides, moreover permit us a functional learning of the phenomena linked to localization and distribution of these effectors. The analyses described in this document are various and beginning with the description with detection of the effectors on thick sections from paraplasm blocks and the use of confocal microscopy. Moreover, in this article are described also protocols and other technical details of the immunedetection of the effectors before or after the embedding in the resin associated to analyses developed for electronic microscopy in cells and little pieces of tissues dissected.

Keywords: *Immunocytochemistry, antimicrobial peptides, confocal microscopy, transmission electron microscopy.*

1. Introducción

La inmunohistoquímica es una técnica para identificar constituyentes celulares o tejido mediante el uso de interacciones antígeno anticuerpo, en donde el sitio de unión al anticuerpo es identificado tanto por marcado directo del anticuerpo o por el uso de método secundario.

Los procedimientos de inmunocitoquímica descritos a continuación fueron desarrollados por nosotros para localizar péptidos antimicrobianos y estudiar su participación en la

defensa durante infecciones experimentales microbianas [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Sin embargo, ellos pueden ser aplicados para la detección y localización de cualquier otro efector o proteínas.

Las técnicas utilizadas de microscopía electrónica fueron adaptadas de el método pre-embibimiento desarrollado por el Laboratorio de Virginia Pickel's [8] y de el método de post-embibimiento desarrollado por [9].

Como con cualquier adaptación, el éxito de éstos diferentes métodos se encuentra ligado con la calidad de reactivos aplicados y especialmente sobre la sensibilidad específica de los anticuerpos. Así, ciertos cuidados deben ser considerados, primero probar la selectividad de los anticuerpos por ELISA contra moléculas nativas o recombinantes, para posteriormente identificar las moléculas reconocidas por Western Blot.

2. Materiales y métodos.

2.1 Preparación de Hemocitos para microscopía de luz clásica

Los hemocitos fueron colectados utilizando un volumen de antiagregante, la Solución Modificada de Alserver (MAS), cuya composición es 27 mM de citrato de sodio, 336 mM de NaCl, 115 mM de glucosa, 9 mM de EDTA, pH 7, conteniendo 8 % de paraformaldehído. En camarones, la extracción de la hemolinfa fue realizada en seno ventral en la base del primer segmento abdominal. En mejillones, la colección de la hemolinfa fue hecha desde el músculo abductor posterior.

Las células fueron fijadas por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugadas 5 minutos a 1,000 g sobre portaobjetos Poly-lysinated. (Cyto Tek

centrifuge). Luego, los portaobjetos fueron almacenados a -20°C .

2.2 Preparación de tejido

Para estudiar la inmunoreactividad sobre todo el animal, los tejidos de los animales adultos (camarones y mejillones) fueron fijados en el Fijador de Davidson variante amigable con los ARN (349 ml de formaldehído al 37%, 407 ml de etanol al 95%, 22 ml de Hidróxido de Amonio enrasando a 1 lt de agua destilada a pH 6.0 a 6.5. Alternativamente también fueron fijados en Paraformaldehído disuelto en 0.1 M de Tampón Fosfato (PB) conteniendo 10% de sacarosa.

Los tejidos fueron deshidratados por 3 baños sucesivos de etanol al 70% de 20 minutos, luego 3 baños en etanol al 90% y finalmente 3 baños de etanol al 100%. Luego los tejidos fueron incubados en etanol al 100% toda la noche. Todos los baños y la incubación fueron realizados a temperatura ambiente (TA).

Los tejidos fueron sometidos al proceso de embibimiento en Paraplast, Así, se realizaron a 3 baños de 20 minutos en xileno a TA, seguido de una incubación en xileno de al menos 12 horas a TA, luego fueron sumergidos en una solución de xileno/Paraplast (v/v) de 12 horas a 60°C . Posteriormente a los tejidos se los sometió a 3 baños de 1 hora en paraplast. Finalmente se prepararon los bloques de paraplast. Una vez preparados los bloques de Paraplast se procedió a realizar cortes de 7 μm , los cortes fueron montados en portaobjetos poly-L-Lysinados y almacenados a 4°C hasta su uso.

2.3 Inmunohistoquímica usando amplificación a la plata sobre cortes histológicos

Se eliminó la parafina y se hidrató los cortes histológicos por baños consecutivos en xileno (2 baños de 15 minutos), etanol al 96% (2 baños de 5 minutos), etanol al 70% (1 baño de 5 minutos), luego de lo cual se realizaron 2 inmersiones rápidas en agua destilada. Posteriormente se lavó las secciones en Tampón Fosfato Salino (PBS, 0.1 M pH 7,4 tampón fosfato, conteniendo 0.9% de ClNa) por 10 minutos, se pre-incubaron los cortes histológicos en una solución de PBS que contiene 1% de Albumina de Suero Bobino (BSA), 1% de Suero de Cabra Normal (NGS) PBS/BSA/NGS suplementado con 1% de gelatina (Tampón I) por 1 hora. Seguidamente, se incubó con el primer anticuerpo (ejemplo, anti-Penaeidin IgG, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en tampón I toda la noche. Los anticuerpos no adheridos se

lavarón mediante 2 baños de 10 minutos en PBS. Los cortes fueron entonces incubados con el segundo anticuerpo marcado al oro coloidal (e.g. anti-IgG de ratón marcado al oro coloidal de 1nm) diluido 1/50 en tampón I por 2 horas a TA. A continuación, se lavó 3 veces por 10 minutos en PBS. Posteriormente se equilibró en 0.2 M Tampón Citrato, pH 7.4, mediante 2 baños de 5 minutos. Luego se realizó la amplificación a la plata con el Kit IntenSE™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez terminado el revelado se lavó 2 veces por 2 minutos en agua destilada. Finalmente se tiñeron los cortes utilizando azul de Evans o azul de toluidina (0.1%) y se examinó al microscopio de luz.

2.4 Procedimientos inmunohistoquímicos para realizar la Microscopía confocal

2.4.1 Inmunofluorescencia simple

Las células previamente fijadas y citocentrifugadas sobre placas poli-Lysine en citoespinas (5 min a 1000 rpm) fueron pre-incubadas por 1 hora en 0.1M Tris-HCl, pH 7.4, 0.9% NaCl (TBS), conteniendo 3% de NGS. A continuación, fueron incubadas toda la noche con una concentración previamente definida (ejemplo, anti-Penaeidin IgG, 10 µg/ml) del primer anticuerpo diluido en TBS suplementado con 2% NGS y 0.01% de Triton X-100. Las células fueron posteriormente lavadas 3 veces con baños de 5 minutos en TBS. Luego, fueron incubadas 2 horas a TA con el segundo anticuerpo marcado con un compuesto fluorescente (ejemplo anti-suero marcado con Texas-red o FITC). Finalmente los portaobjetos fueron montados en glicerol que contenía 25% de TBS y 0.1% de P-phenylenediamine. Las células marcadas fueron observadas inmediatamente después del montaje usando un microscopio Leica Laser Scanning (TCS NT) equipado con un microscopio invertido Leica (DMURBE) y un laser Argón/Kriptón.

2.4.2 Inmunofluorescencia doble

Las células previamente fijadas y citocentrifugadas sobre placas poli-Lysine en citoespinas (5 min a 1000 rpm) fueron pre-incubadas por 1 hora en TBS, conteniendo 3% de NGS. A continuación, fueron incubadas toda la noche con una mezcla de anticuerpos (la cual depende del péptido a detectar, ejemplo 1:5000 de antisuero anti-Defensine preparado en ratón y 10 µg de anti-Mytilin IgG preparados en conejo) del primer anticuerpo diluido en TBS suplementado con 2% NGS y 0.01% de Triton

X-100. Las células fueron entonces lavadas 3 veces por 5 minutos con TBS. Luego, los cubreobjetos conteniendo las células fueron incubados a TA con una mezcla de anticuerpos secundarios (ejemplo, anti IgG de ratón marcado con FITC preparados en cabra y anti IgG de conejo marcado al Texas-red preparados en cabra) diluidos en TBS conteniendo 2% de NGS. Luego, las células fueron lavadas 3 veces con baños de 5 minutos de TBS. Finalmente los portaobjetos fueron montados en glicerol que contenía 25% de TBS y 0.1% de P-phenylenediamine. Las células marcadas fueron observadas inmediatamente después del montaje usando un microscopio Leica Laser Scanning (TCS NT) equipado con un microscopio invertido Leica (DMURBE) y un laser argón/kriptón. La señal de FITC fue detectada usando un filtro de excitación de band-pass de 488 nm, y para la señal del Texas-red las muestras fueron excitadas a 568 nm. Las imágenes fueron adquiridas como secciones ópticas simples del medio de las células o a través de múltiples niveles seriados de Z de 16 escaneados por recuadro.

2.5 Microscopía Electrónica

2.5.1 Marcaje al Inmunogold: procedimiento de pre-embibimiento

Sedimentos de células (10^7 células) o pequeñas piezas de tejidos seleccionados fueron fijados por 2 horas a 4°C en un mezcla de 4% de paraformaldehído, 0.2 % de ácido pícrico y 0.1% de glutaraldehído disueltos en PBS. Luego, las células o tejidos disectados fueron lavados usando baños de 5 minutos con PBS. A continuación, las muestras fueron preincubadas con TBS con 1% NGS y 1% BSA (TBS/NGS/BSA) durante 30 minutos a TA. Posteriormente, fueron incubadas con el anticuerpo primario (ejemplo anti-MGD2 IgG, 10 mg/ml) en TBS/NGS/BSA por 14 horas a 4°C. Después, de esta incubación las células fueron lavadas 3 veces por 10 minutos en TBS. Una vez terminados los lavados, las células fueron equilibradas en Tampón Citrato mediante 2 baños de 5 minutos en ese tampón. Luego, las muestras fueron post-fijadas en PBS conteniendo 1% de OsO₄ por 30 minutos. Las muestras fueron deshidratadas y embebidas en Epon en forma clásica para microscopía electrónica. Posteriormente cortes ultrafinos (90 nm de grosor) de diferentes bloques fueron realizados, estos cortes fueron inmediatamente colocados y fijados en rejillas de cobre de ojo de malla de 200. Finalmente, los cortes fueron teñidos con acetato de uranilo y Reynold's antes de ser observados al microscopio electrónico.

2.5.2. Marcaje al Inmunogold: procedimientos post-embebimiento.

2.5.2.1 Preparación de la muestra para los procedimientos de post-embebimiento

Se colectó la muestra (hemocitos o tejidos) de acuerdo a lo descrito en 2.1 y se fijaron los sedimentos de células (10^7 células) o pequeñas piezas de tejido por 2 horas a 4°C en una mezcla de 4% de paraformaldehído, 0.2 % de ácido pícrico, 0.1% de glutaraldehído y 10 % de sucrosa disueltos en PBS. Las muestras fueron post-fijadas en 1% de OsO_4 por 5 minutos y finalmente deshidratadas y embebidas en la resina LR White.

2.5.2.2 Cortes semifinos

Se realizaron cortes de $0.1\ \mu\text{m}$ de grosor usando un ultramicrotomo y se ubicaron los cortes sobre portaobjetos en una pequeña gota de agua destilada dejándose secar sobre una plancha de calentamiento (100°C por 5 minutos). Posteriormente, se preincubaron las muestras en TBS/NGS/BSA por 30 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo primario (ejemplo, anti-Mytilin B IgG, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) en TBS/NGS/BSA 14 horas a 4°C . Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras fueron lavadas mediante 3 baños de TBS de 10 minutos. Posteriormente se equilibró la muestra en tampón citrato, para inmediatamente después realizar la tinción a la plata con el Kit IntenSETM de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción de amplificación se detuvo utilizando 2 baños de 2 minutos en agua destilada. Finalmente antes de observar en el microscopio óptico, se realizó la contra-coloración usando azul de toluidine (1/1000).

2.5.2.3 Marcaje simple al inmunogold

Los cortes de las muestras de $90\ \mu\text{m}$ fueron colectados y depositados en rejillas de 200 de níquel. Luego las secciones fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 10% durante 8 minutos. Luego fueron preincubadas en TBS/NGS/BSA por 10 minutos a TA. Posteriormente fueron incubadas por 48 horas a 4°C con el primer anticuerpo (ejemplo, anti-Penaeidin IgG, $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$) diluido en TBS/NGS/BSA. A continuación, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario ($10\ \text{nm}$ IgG anti conejo marcados al oro coloidal preparados en cabra) diluido 1/50 en el tampón

precedente. Una vez finalizada la incubación con el segundo anticuerpo se procedió a lavar 3 veces con TBS por 10 minutos. Las muestras fueron post-fijadas en TBS conteniendo 1% de glutaraldehído. Esta fijación entrecruza los anticuerpos secundarios y primarios. Luego, se procedió a realizar 2 baños de 5 minutos en agua destilada a las muestras. Finalmente antes de observar las muestras al microscopio electrónico se procedió a realizar una tinción con acetato de uranilo.

2.5.2.4. Marcaje doble al inmunogold

El procedimiento para el doble marcaje es idéntico al descrito para el marcaje simple exceptuando la incubación con el primer anticuerpo y la incubación con el segundo anticuerpo. La primera incubación esta vez se realiza con 2 anticuerpos como por ejemplo $10\ \mu\text{g}$ de IgG anti-Mytilin preparados en conejo y 1/5000 de antisuero anti-Defensin preparado en ratón. La segunda incubación se realiza en TBS/NGS/BSA conteniendo anti IgG de conejo marcado con partículas de oro coloidal de 5 ó $18\ \text{nm}$ preparados en cabra y anti IgG de ratón marcado al oro coloidal de 5 ó $18\ \text{nm}$ preparados en cabra, ambos anticuerpos diluidos 1:50.

3. Resultados y Discusión.

En el presente trabajo se realiza una descripción de métodos adaptados por los autores para la detección de péptidos antimicrobianos del camarón y mejillón.

Los análisis realizados con cortes histológicos para microscopía óptica son consecuentes con la utilización de nuestros protocolos para determinar la localización y el estudio funcional de efectores antimicrobianos. Estos protocolos han sido utilizados con éxito para otras especies, en donde ellos funcionan apropiadamente (datos no presentados).

De nuestras observaciones, podemos también establecer que dentro de los distintos métodos de detección utilizados en cortes histológicos provenientes de bloques de parafina, el método de tinción a la plata parece el más sensible. Sin embargo, los métodos utilizando fosfatasa alcalina u otros métodos con marcadores fluorescentes son igualmente apropiados para la detección de efectores antimicrobianos.

La utilización de microscopía confocal se reveló particularmente informativa, esta nos permitió co-localizar los efectores dentro de un mismo compartimento celular. Las inmunodetecciones pueden ser hechas secuencialmente. Sin embargo, nosotros mezclamos los anticuerpos primarios y

secundarios como se encuentra descrito en materiales y métodos. Del mismo modo como una recomendación para futuros utilizadores de esta técnica, se debe procurar siempre controlar la reacción cruzada entre los dos anticuerpos. Esta puede ser controlada por la omisión de uno o ambos anticuerpos primarios. Así, cuando el anticuerpo primario anti-Defensin y anti-Mytilin fueron omitidos, la respectiva fluorescencia del FITC o el Texas-red no fue observada en las placas examinadas (datos no presentados). Este hecho, nos provee la evidencia que ninguna reacción cruzada de antisuero secundario ha ocurrido [4].

En nuestro trabajo, utilizando ensayos de fagocitosis, la combinación de internalización de bacteria fluorescente e inmunohistoquímica hizo posible, simultáneamente trazar el recorrido de la bacteria posterior al reconocimiento e internalización dentro de las células inmunitarias [4, 5]. El destino intracelular de las bacterias fagocitadas puede ser monitoreado a través de la visualización combinada de marcadores específicos de compartimentos por inmunohistoquímica. Nosotros combinamos la visualización de bacteria fluorescente con la detección por inmunocitoquímica de Mytilin B (péptido antimicrobiano) por microscopía confocal (figura 1).

La doble localización de Mytilin B y la bacteria fluorescente fue realizada usando el microscopio confocal debido (i) al fácil marcado de las bacterias con compuestos fluorescentes; (ii) la cercana asociación entre la bacteria y la Mytilin B en el mismo compartimento celular, la cual puede ser claramente demostrada por la medición de la intensidad de fluorescencia a lo largo de eje cruzando un hemocito (Figura 1); (iii) numerosas células pueden ser observadas haciendo un análisis estadístico posible [4].

Además, podemos establecer que los protocolos descritos anteriormente pueden ser adaptados para detectar efectores inmunes en secciones de parafina también (datos no presentados). Sin embargo, el uso de anticuerpos secundarios acoplados a la fluoresceína debe ser evitado en el camarón, ya que en este animal los tejidos son fluorescentes cuando ellos son excitados a 488 nm.

En lo que concierne a la microscopía electrónica, nuestros resultados demostraron luego de probar dentro de la gran variedad de agentes fijadores para la investigación de efectores inmunes que las mezclas más adaptada para nuestros propósitos contenían paraformaldehído, glutaraldehído y ácido pícrico. En esta forma podemos determinar que tanto el glutaraldehído como el ácido pícrico

confieren un excelente grado de preservación ultraestructural. En el mismo sentido podemos también definir que estos compuestos en altas concentraciones, pueden afectar la antigenicidad del tejido afectado. Así, nuestras observaciones consideran apropiadas las concentraciones que son descritas en los materiales y métodos en las cuales los autores han trabajado para no alterar la antigenicidad de los tejidos. De esta manera, se pudo llevar a cabo la detección de péptidos antimicrobianos sin una pérdida representativa de la señal que podría haber afectado la detección de estos efectores.

Además de la fijación primaria, se hace necesaria para la microscopía electrónica la post-fijación, la cual fue llevada a cabo con tetraóxido de osmio, el cual ayuda a la preservación ultraestructural y la tinción de la bicapa de lípidos. La post-fijación, incluye también un segundo paso que es la post-fijación con altas concentraciones de glutaraldehído (usualmente 1%), este tratamiento ayuda al cross-linking del anticuerpo secundario con el anticuerpo primario.

La tinción inmune puede ser desarrollada también sobre secciones semifinas (0.1 μm) lográndose obtener informaciones subcelulares [6, 7]. Sin embargo esta detección es usualmente hecha para chequear la preservación ultraestructural de los tejidos antes de realizar procedimientos ultraestructurales largos. Además, esta detección nos ayuda a determinar también la capacidad de un determinado anticuerpo para detectar el antígeno en los tejidos embebidos de resina.

El paso de amplificación a la plata es quizás el más delicado de todo el protocolo de tinción al inmunogold. Mucho cuidado deberá ser tomado no solamente para encontrar el tiempo óptimo de incubación para cada preparación específica, pero también para reducir cualquier variabilidad de tiempo entre condiciones (ejemplo, entre animales estimulados y no estimulados). Una sobre-exposición del tiempo de incubación resultará en una sobre-saturación de la señal específica y la generación de un exagerado ruido de fondo. Dentro de un cierto rango, sin embargo, la variación del tiempo de incubación solamente modulará el diámetro de los granos de plata. Así, incubaciones largas formarán grandes partículas haciendo fácil visualizar el espécimen a baja magnificación, lo que permitirá un análisis más rápido. De ninguna manera, las partículas de oro intensificadas a la plata deben ser tan grandes, como para obscurecer los detalles finos de la preparación y en esta forma hacer imposible la observación, por ejemplo, de la cercana asociación del marcaje con pequeños compartimentos intracelulares (figura 2)

4 Conclusiones

El presente artículo es una revisión de técnicas y protocolos utilizados para la detección de péptidos antimicrobianos de camarones y mejillones. Muchos de estas técnicas y protocolos fueron adaptados para su uso en la detección de estos efectores en dichos animales. El uso combinado de herramientas como la microscopía óptica, microscopía confocal y microscopía electrónica permitieron tener una visión de conjunto para la descripción los fenómenos concernientes tanto de la expresión como de la distribución de estos péptidos antimicrobianos. El uso de la microscopía óptica aportó con interesantes informaciones descriptivas acerca de la distribución de dichos péptidos y su papel funcional. La microscopía confocal a su vez fue una herramienta determinante para la definición de la ruta de bacterias fagocitadas y su relación

con los péptidos antimicrobianos. Mientras la microscopía electrónica aportó observaciones ultraestructurales que permitieron determinar la ubicación exacta dentro de la célula de estos efectores. Esta herramienta nos permitió además co-localizar 2 efectores en el mismo compartimento celular, gracias al uso de anticuerpos secundarios marcados a partículas de oro de diferentes tamaños. Así, estas técnicas y protocolos descritos nos permitieron comprender mejor el papel de estos efectores en la respuesta de defensa tanto de los camarones como de los mejillones. Finalmente se puede sostener que estas herramientas y protocolos son de particular interés para investigadores interesados no solo en una descripción de la simple distribución de diferentes efectores, si no también de la comprensión de fenómenos fisiológicos asociados a dichos efectores, en nuestro caso particular en la respuesta inmune de camarones y mejillones.

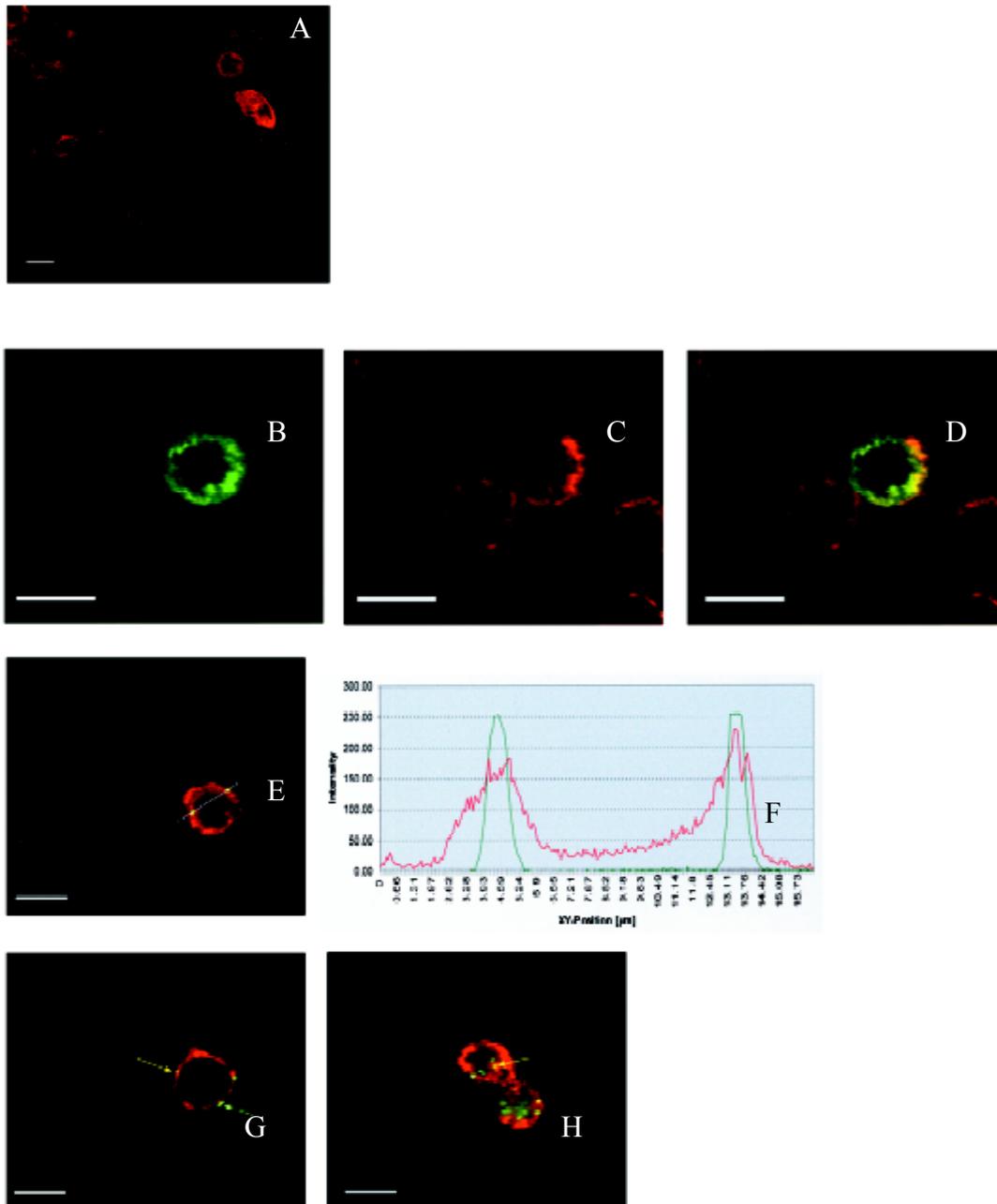


Figura 1. Imágenes de microscopía confocal de inmuo-marcaje de péptidos antimicrobianos en camarón y mejillón de hemocitos circulantes. (A) Fuerte inmunoreactividad en hemocitos de camarón citocentrifugados realizado mediante inmunodetección con anticuerpo secundario marcado al Texas red. (B, C y D) Imágenes de doble inmunodetección en hemocitos mejillón de Defensins (verde) y Mytilins (rojo). D. Imágenes de microscopía confocal fusionadas de B y C, sugieren que Defensins y Mytilins son empaquetadas en el mismo compartimento hemocítico. (E, F y G) Localización dual de inmunoreactividad de Mytilins (rojo) y bacteria fluorescente fagocitada (verde) observadas por microscopía confocal. Los hemocitos de mejillón fueron incubados por 20 minutos en presencia de *Vibrio alginolyticus* marcado al FITC, para luego ser fijados y sometidos a detección inmunocitoquímica de Mytilins usando anticuerpos secundarios marcado al Texas red. Medición de la intensidad de fluorescencia a lo largo de un eje de cruce del hemocito (E). Confirmación que las bacterias (F perfil verde) están localizadas en organelos que contienen Mytilin (F, perfil rojo). Análisis de microscopía confocal permitiéndonos determinar que los hemocitos que contenían Mytilins fueron capaces de realizar fagocitosis (G y H). Inmunoreactividad de Mytilins colocolizada con bacterias (flechas amarillas) o sin colocolización (flechas verdes). Barras 10 μm .

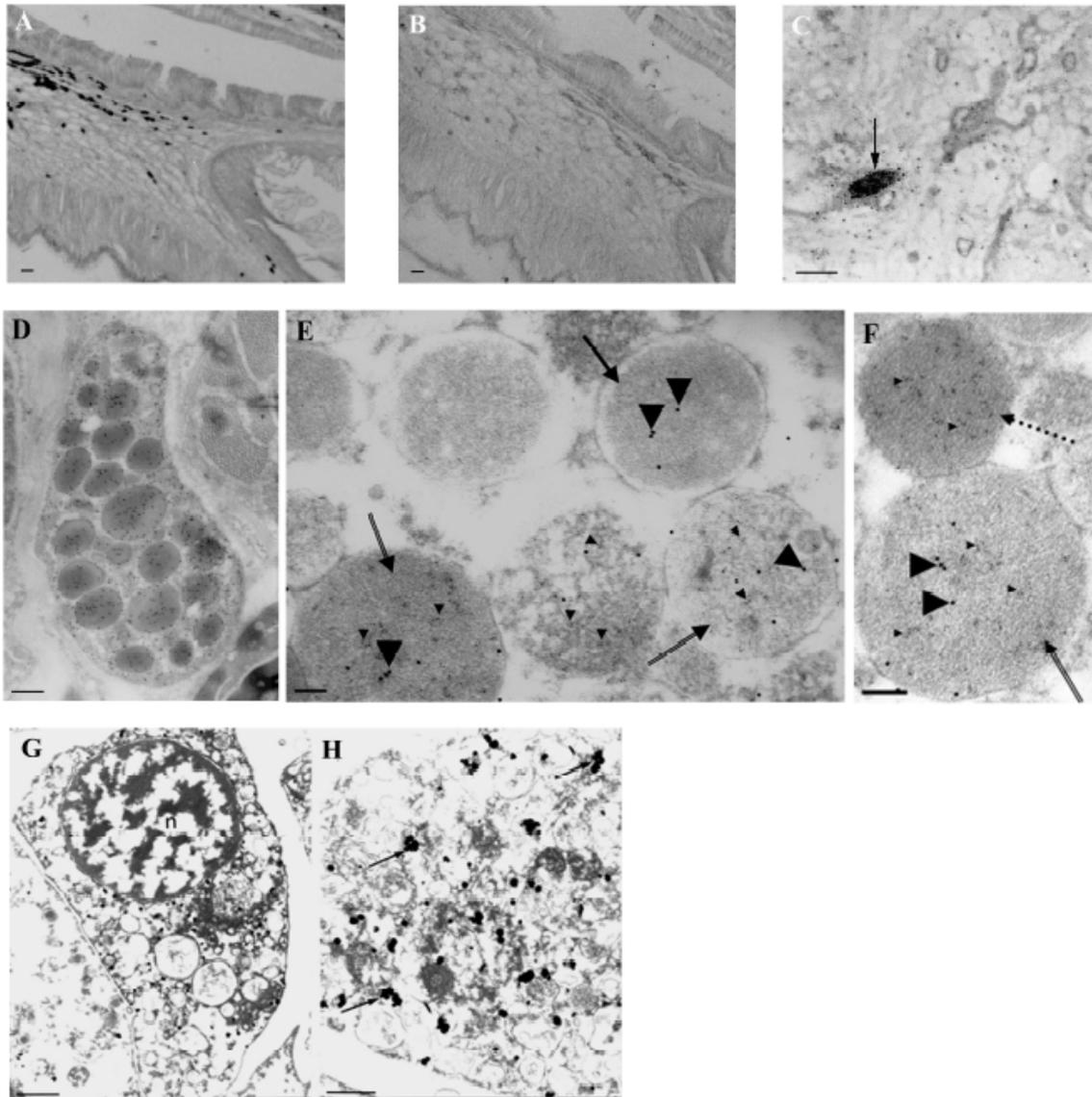


Figura 2. Inmunodetección de péptidos antimicrobianos en hemocitos de camarones y mejillones. (A) Inmunoreactividad sobre secciones embebidas en parafina de camarones procesados para la detección de Penaeidins usando anticuerpos anti-Penaeidin y anticuerpos secundarios marcados con partículas de oro detectados por la reacción específica de amplificación a la plata. Barra 10 μm . (B) Control de la misma inmunodetección como en (A) pero el anticuerpo antipenaeidin fue previamente pre-absorbido con el Penaeidin recombinante. Barra 10 μm . Inmunoreactividad de Penaeidin sobre cortes semifinos. La inmuno-tinción de hemocitos infiltrantes fue observada usando anticuerpos antipenaeidin y el anticuerpo secundario marcado con partículas de oro, detectados por amplificación a la plata. Barra 10 μm . (D) Distribución ultraestructural de inmunoreactividad de Penaeidin en tejidos de camarón. Los tejidos disectados fueron fijados, embebidos en resina L R White e inmuno-teñidos para Penaeidin usando anticuerpos secundarios conjugados a partículas de oro de 10 ηm . Numerosas partículas de oro están presentes en grandes gránulos densos de hemocitos infiltrados en los tejidos. (E y F) Distribución ultraestructural (marcado al inmunogold doble) de Defensins y Mytilins en hemocitos circultantes. Partículas de oro de 18 ηm (grandes flechas) corresponden a Defensins y partículas de 5 ηm (pequeñas flechas) corresponden a Mytilins. Note la presencia de granulos conteniendo (i) solo Defensins (flecha), (ii) solamente Mytilins (flecha punteada) y (iii) tanto Defensins como Mytilins (Doble flecha). Barra 0.5 μm (E), 0.75 μm (F). (G y H) Distribución ultraestructural de Defensins en hemocitos circultantes de mejillón que fueron procesados para un procedimiento inmunocitoquímico de preembimamiento usando anticuerpos secundarios conjugados a partículas de oro de 1 ηm y la reacción de amplificación a la plata. La inmuno-tinción aparece como depósitos de plata oscuros. Granos de plata fueron principalmente observados sobre pequeñas vesículas. Barra 0.5 μm .

5. Referencias

1. Destoumieux D., Munoz M., Cosseau C., Rodriguez J., Bulet P., Comps M., Bachère E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell. Science*, 113, 461-469.
2. Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Roch P., 1999. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell. Science*, 112, 4233-4242.
3. Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Salzet M., Roch P., 2000a. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *Journal. Biological. Chemistry*, 275, 12954-12962.
4. Mitta G., Vandenbulcke F., Noël T., Romestand B., Beauvillain J.C., Salzet M., Roch P. 2000b. Differential distribution and defense involvement of antimicrobial peptides in mussel. *Journal of. Cell. Science*, 113, 2759-2769.5.
5. Mitta G., Vandenbulcke F., Roch P. 2000c. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters*. 2000c. 486 (3) 185-190.
6. Muñoz M., Vandenbulcke F., Saulnier D., Bachère E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by hemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *European. Journal of Biochemistry*, 269, 2678-2689.
7. Muñoz M., Vandenbulcke F., Gueguen Y., Bachère E., 2003. Expression of antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*. 269 (11) 2678-89.
8. Chan J., Aoki C., Pickel V.M., 1990. Optimization of differential immunogold-silver and peroxidase labeling with maintenance of ultra-structure in brain sections before plastic embedding. *J. Neuroscience.*, 15, 113-127.
9. Beauvillain J.C., Mitchell V., Tramu G., Mazzuca M., 1988. GABA axon terminals in synaptic contact with enkephalin neurons in the hypothalamus of the guinea pig. Demonstration by double immunocytochemistry. *Brain Research.*, 443, 315-320.