

Análisis de Localización y Distribución de ARNm de Péptidos Antimicrobianos Expresados en Células de Camarón por Hibridación *in Situ*

M. Muñoz¹, A. Desmons², E. Bachère³, F. Vandebulcke²

¹ Laboratorio de Biología. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Km 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador.

² Laboratoire d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie. EA 3570. Université de Lille 1. Cité scientifique, Batiment SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. ³ IFREMER. Centre Nationale de la Recherche Scientifique. Université de Montpellier 2, Unité Mixte de Recherche 5119, Ecosystèmes Lagunaires, CC 80, 2 place Eugène Bataillon - 34095 Montpellier Cedex 5, France.

mmunoz@espol.edu.ec¹

Resumen.

La presente publicación describe adaptaciones a métodos para la detección y localización de ARN mensajeros de penaeidins, péptidos antimicrobianos del camarón *Penaeus vannamei*, utilizando marcadores fríos y calientes tanto para muestras correspondientes a células citocentrifugadas como para tejidos incluidos en parafina. Si se describen los procedimientos y adaptaciones para realizar los tratamientos previos a la hibridación en los cuales se determinan los pasos para desparafinar tejidos, tiempos de post fijación y tratamiento con RNasa para preservar las condiciones de los tejidos para una buena observación luego de la hibridación. Además, se establecen los mejores parámetros para preparar ribosondas y se discuten las ventajas de la utilización de este tipo de sondas con respecto a las sondas de doble cadena de ADN. Finalmente se determinan los pasos optimizados para realizar una hibridación y detección de las ribosondas marcadas a la forfatasa alcalina que permitan la mejor definición y sensibilidad en las células objetivo.

Abstract

The present paper describes the adaptation of methods for detection and localization of penaeidins mRNA, antimicrobial peptides of the white shrimp *Penaeus vannamei*, using cold or hot probes for samples corresponding to cytocentrifuged cells or tissues included in paraffin. This work describes the procedures and adaptations for to realize the preliminary treatments for the hybridization as the steps to eliminate the paraffin of the tissues, times of post fixation y treatment with RNase in order to preserve the conditions of the tissues for a good observation after hybridization. Moreover, are established the best parameters to prepare riboprobes are determined and the advantages of the use of these types of probes in relation with double strand DNA probes. Finally, the optimized steps will be determined for to realize the hybridization and detection of riboprobes labeled to Phosphatase alkaline that allow the better definition and sensibility in the target cells.

1. Introducción

Las técnicas de hibridación *in situ* permiten detectar secuencias de ácidos nucleicos específicos en cromosomas preservados morfológicamente, células o secciones de tejidos. En combinación con la inmunocitoquímica, la hibridación *in situ* puede relacionar información topológica microscópica a la actividad de genes a nivel de ADN, ARNm y proteínas.

La técnica fue originalmente e independientemente desarrollada por [1] y [2]. En esta época, el clonaje molecular no era posible y la hibridación *in situ* estaba restringida a secuencias que podían ser purificadas y aisladas por métodos bioquímicos convencionales, como por ejemplo ADN satélite

de ratón, ADN viral, ARN ribosómico. Además radioisótopos eran los únicos marcadores posibles para los ácidos nucleicos, y la autoradiografía era la única forma para detectar las secuencias hibridadas.

Las técnicas de clonaje molecular y mejoras en las técnicas de marcaje, han cambiado dramáticamente este panorama. Por ejemplo, Secuencias de ADN, de algunos pares de bases de largo, pueden ser detectadas en los cromosomas en metafase por autoradiografía [3, 4]. Las técnicas radioactivas pueden también detectar bajo número de copias de ARNm de moléculas en células individuales [5]. Al mismo tiempo, químicamente sintetizados, oligonucleótidos marcados radioactivamente comenzaron a ser utilizados, especialmente para la detección de ARNm por hibridación *in situ*

Recibido: Junio, 2008
Aceptado: Agosto, 2008

[6]. A pesar de la alta sensibilidad y la amplia aplicabilidad, el uso de técnicas de hibridación *in situ* ha estado limitado a los laboratorios de investigación. Esto es probablemente debido a problemas asociados con las sondas radioactivas, las cuales requieren de medidas de seguridad para su uso, limitado tiempo de vida y demasiado tiempo requerido para la autoradiografía. Además, la distribución inherente a la radiactividad hace disminuir los límites de la resolución espacial de estas técnicas.

La preparación de sondas nucleicas con marcadores estables no radioactivos elimina los mayores obstáculos de esta técnica, los cuales entorpecen la aplicación general de la hibridación *in situ*. Además, esto abre nuevas oportunidades para la combinación de diferentes marcadores en un solo experimento. Los numerosos y sensibles sistemas de detección basados en anticuerpos disponibles para detectar sondas nucleicas no radioactivas, además mejoran la flexibilidad de este método. Actualmente, sondas de ARN son probablemente las sondas más ampliamente usadas como sondas nucleicas dentro de las técnicas de hibridación *in situ*.

En el presente artículo, describimos protocolos (métodos radioactivos y no radioactivos) que hemos desarrollado para localizar ARNm en células circulantes y tejidos embebidos en parafina de camarón *Litopenaeus vannamei* [7, 8].

2 Materiales y Métodos.

2.1 Preparación de tejidos y hemocitos

2.1.1 Hemocitos

Se obtuvo hemolinfa de camarones de 8 a 10 gr en estado de intermuda en la base del primer segmento abdominal usando una aguja de 23 g con una jeringuilla de 1 ml conteniendo la mitad del volumen de Solución Tampón Modificada de Alsever, MAS [9]. Los hemocitos fueron centrifugados a 800 X g por 10 minutos a 4°C y eliminado el sobrenadante. Para su fijación los hemocitos fueron resuspendidos en una solución de tampón fosfato (PB, 0.1 M pH 7.4 de tampón fosfato) conteniendo 4 % de paraformaldehído, 10 % de sacarosa por 10 minutos para su fijación. Los hemocitos fueron otra vez centrifugados (800 X g por 10 minutos), el sobrenadante fue eliminado y los hemocitos resuspendidos en PB. La concentración de hemocitos de la suspensión fue establecida con un hemocitómetro. Posteriormente, entre 10^5 y 2×10^5 hemocitos fueron citocentrifugados en un portaobjetos con poli-L-lisina (1000 rpm, 5

min.) y secados a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

2.1.2 Tejidos

Tejidos disectados de camarón fueron fijados en una solución recientemente preparada del fijador Davidson [10] por 72 horas a 4°C o en solución de paraformaldehído al 4% conteniendo 10 % de sacarosa. Los fijadores fueron cambiados cada 24 horas. Luego de la fijación, los tejidos fueron deshidratados con 3 baños sucesivos de 20 minutos en etanol al 70%, seguido de 3 baños de 20 minutos en etanol al 90%, se continuó con 3 baños de 20 minutos en etanol al 100% y finalmente las muestras fueron incubadas en etanol al 100% a temperatura ambiente toda la noche.

La inclusión en paraplast fue realizada mediante 3 inmersiones en xileno de veinte minutos, los tejidos fueron posteriormente incubados en una solución (v/v) de xileno/paraplast por 12 horas a 60°C, luego las muestras fueron sometidas a 3 incubaciones en paraplast de 1 hora a 60°C. Finalmente los bloques con el tejido en su interior fueron preparados. Una vez preparados los bloques, cortes de 8 µm fueron realizados, las secciones de parafina con tejido incluido fueron montadas en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y almacenadas a 4°C hasta uso.

2.2 Preparación de Ribosondas

Plásmidos (20 µg) conteniendo la secuencia de ADNc de penaeidin 3 fueron linearizados por digestión con BamHI para producir la ribosonda antisentido y con Not I para producir la ribosonda sentido. Posteriormente, a 100 µl de plásmidos linearizados se le añadió 50 µl de acetato de amonio 7.5 M y 250 µl etanol enfriado a -20°C. Luego, los plásmidos fueron incubados a -80°C al menos por una hora. A continuación de la incubación, los plásmidos fueron centrifugados 20 minutos a 13000 rpm a 4°C. El sedimento fue secado a temperatura ambiente y suspendido en 20 µl de agua tratada al dietilpirocarbonato (DEPC). La verificación y cuantificación de los plásmidos linearizados fue realizada sobre geles de agarosa usando el marcador de talla Smart Ladder size.

A partir de los plásmidos linearizados se generaron ribosondas sentido y antisentido DIG-UTP o ³⁵S-UTP por transcripción *in vitro* usando transcription RNA labeling Kit (Roche). Para estas transcripciones, fueron usados 1 µg de ADN de plásmido linearizado de acuerdo a los procedimientos del fabricante. Así, ARN polimerasas T7 y T3 generaron las sondas sentido y antisentido respectivamente. La

reacción de transcripción de cada una de las sondas fue parada con 1 μ l de 0.5 M de EDTA. A la solución producto de la transcripción se le añadieron 80 μ l de agua libre de RNasa, 5 μ l de ARNt (10.3 mg/ml), 10 μ l del LiCl 4M y 300 μ l de etanol a -20°C . Las soluciones con las sondas fueron incubadas a -80°C por al menos 1 hora y luego centrifugadas por 20 minutos a 12000 x g a 4°C . Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue lavado con etanol al 70% a -20°C y centrifugado por 5 minutos a 12000 x g a 4°C . Finalmente, el sobrenadante fue eliminado nuevamente y los sedimentos fueron secados sobre hielo y los sedimentos fueron secados sobre hielo y resuspendidos en 100 μ l de agua tratada con DEPC (para las sondas marcadas con DIG-UTP) o en 100 μ l de una solución preparada usando 10 μ l de DTT 1M y 90 μ l de Tris-EDTA (para las sondas marcadas al ^{35}S)

2.3 Tratamientos de prehibridación.

2.3.1 Hemocitos

El tratamiento de prehibridación de los hemocitos comenzó con 2 inmersiones de 5 minutos de las células citocentrifugadas en una solución de Tris-HCl 0.2 M pH 7.4. Luego las células fueron incubadas por 10 minutos en Tris-HCl 0.2 M pH 7.4 conteniendo glicina 0.1 M. Las células fueron incubadas en Tampón Fosfato Salino (PBS) 0.1 M pH 7.4. Posteriormente, se realizó un paso de post-fijación, incubando las preparaciones en una solución de 4% de paraformaldehído diluido en PB conteniendo 5 mM de MgCl_2 durante 15 minutos. Las células fueron lavadas con PBS durante 5 minutos. Después de la post-fijación, las células fueron incubadas en trietanolamina 0.1 M pH 8 conteniendo 0.25% de anhídrido acético por 10 minutos. Luego las células fueron lavadas (2 veces por 5 minutos en 2X SSC y luego una inmersión rápida en agua destilada) y las muestras posteriormente fueron enjuagadas en soluciones de distinto grado de etanol (30%, 70%, 100%, baños de 5 minutos en cada uno respectivamente). Finalmente las células fueron secadas a temperatura ambiente por 2 horas.

2.3.2 Tejidos

El tratamiento de prehibridación de los tejidos se inició removiendo la parafina e hidratando mediante 2 baños consecutivos en tolueno de 15 minutos, 2 baños de 5 minutos en etanol al 96%, 1 baño de etanol al 70% de 5 minutos, 1 baño de 5 minutos en etanol al 30% y finalmente 2 baños en Tris-HCl pH 7.4 de 5 minutos. El bloqueo del paraformaldehído se realizó por

medio de una incubación de 10 minutos en Tris-HCl pH 7.4 conteniendo 0.1M de glicina. Las secciones de los tejidos fueron digeridas con proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluida en Tris-HCl 0.1M pH 8 con 0.05M EDTA por 15 minutos a 37°C . Las muestras fueron posteriormente enjuagadas en PBS. Luego se realizó la post-fijación con paraformaldehído 4% disuelto en PB conteniendo 5 mM de MgCl_2 durante 15 minutos. Las muestras fueron lavadas en 2X SSC (2 x 5 minutos) seguido de un baño en agua destilada para posteriormente deshidratar las muestras mediante baños en soluciones de grados seriados de etanol (30, 70 y 100%, cada baño de 5 minutos). A continuación los cortes fueron secados a temperatura ambiente por 2 horas.

2.4 Hibridación con ribosondas

2.4.1 Hemocitos

La hibridación con las ribosondas fue llevada a cabo utilizando tampón de hibridación preparado en 2X SSC conteniendo 50% de formamida, 10% de dextrán sulfato, 10X de solución Denhardt's, 0.5 mg/ml ARNt de *Escherichia coli*, 100mM dithiothreitol y 0.5 mg/ml de ADN de esperma de salmón. Se agregaron de 40-100ng por portaobjeto de ribosondas marcadas con DIG y 100 ng (1×10^6 cpm) de sondas marcadas con ^{35}S . Los portaobjetos fueron incubados toda la noche a 55°C en cámara húmeda. Una vez terminada la hibridación, los cortes fueron lavados 2 veces por 15 minutos con 2X SSC. Las muestras fueron posteriormente tratadas con 2 baños de 15 minutos a 37°C con ARNasa A (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) disuelta en 2X SSC. Luego las muestras fueron consecutivamente lavadas con 1X SSC suplementado con 0.007% de mercaptoetanol (2 veces por 5 minutos a temperatura ambiente), a continuación luego fueron lavadas con 0.5X SSC suplementado con 0.07% de mercaptoetanol por 5 minutos a temperatura ambiente, a continuación se realizó un baño en 0.1X SSC con 0.07% de mercaptoetanol por 5 minutos a temperatura ambiente y finalmente dos baños 0.1X SSC adicionando con 0.07 % de mercaptoetanol por 15 minutos a 55°C . Posteriormente, los cortes histológicos permanecieron sobre hielo por aproximadamente 1 hora en la misma solución.

2.4.2 Tejidos

Los tejidos fueron hibridados como los hemocitos variando desde el paso de tratamiento con las ARNasa, según las descripciones a continuación. Las muestras con los tejidos

fueron tratadas con ARNasa (20µg/ml en 2X SSC) por 15 minutos a 37 °C y consecutivamente lavadas con 1x SSC con 0.07% de mercaptoetanol (2 baños de 10 minutos a temperatura ambiente, 0.5X SSC suplementado con 0.07% de mercaptoetanol por 10 minutos a temperatura ambiente, 0.1X SSC con 0.07% de mercaptoetanol por 10 minutos a temperatura ambiente). A continuación se realizó dos baños de 30 minutos a 55°C en 0.1X SSC suplementado con 0.07% de mercaptoetanol. Finalmente las cortes sumergidos en la misma solución con mercaptoetanol fueron colocados sobre hielo durante 1 hora aproximadamente.

2.5 Detección de Ribosondas

2.5.1. Ribosondas marcadas con Digoxigenina

Los portaobjetos con las muestras fueron lavadas con 0.1X SSC sin mercaptoetanol por 5 minutos, luego los portaobjetos fueron lavados 2 veces por 5 minutos con tampón A (0.1M Tris HCl, 0.9% NaCl, pH 7,4) adicionándole 0.05% triton. En esta forma, las muestras fueron preincubadas durante 20 minutos en tampón A adicionando 1% de suero normal de cabra y 0.05% de tritón. Luego de la preincubación, se adicionaron 500 µl por portaobjeto de una solución diluida 1/1000 de anticuerpo anti-digoxigenina diluido en buffer A, conteniendo 1% de suero de cabra normal y 0.05% de tritón e incubados toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Posteriormente, los portaobjetos con las muestras fueron lavados primero 3 veces por 10 minutos en tampón A seguido de un lavado de 10 minutos en tampón B (0.1M Tris HCl, 0.9% NaCl suplementado con 50 mM MgCl₂, pH 9.5). Luego se incubó por 2 ó 3 horas a temperatura ambiente en la oscuridad con el sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina (375 µg/ml of NBT/ 188 µg/ml of BCIP/ 1mM de levamisole) preparado en tampón B. La reacción de revelador fue detenida con un baño de 5 minutos en tampón A suplementado con 1mM de EDTA y lavado 2 veces por 10 minutos en tampón A. Finalmente los portaobjetos con las muestras fueron enjuagados rápidamente en agua destilada. Se realizó una contracoloración con azul de toluidina 1/1000 y los cortes fueron montados en una mezcla de glicerol/tampón A (9 vol/1 vol) o con XAM, después de una rápida deshidratación de baños sucesivos en etanol.

2.5.2 Ribosondas marcadas con ³⁵S.

Los portaobjetos con las muestras fueron lavados en 0.1X SSC sin mercaptoetanol por 5

minutos a temperatura ambiente. Después, las muestras se rociaron rápidamente con etanol al 70%. Posteriormente, los portaobjetos con las muestras fueron secados a temperatura ambiente. Luego las muestras fueron expuestas en películas β-max casetes de exposición a rayos X por un período de 2 a 3 días a temperatura ambiente. Al final del periodo de exposición, la película fue revelada en D19B por 2 minutos con 30 segundos y fijadas con el fijador Unifix por 10 minutos. Posteriormente, los portaobjetos con las muestras fueron sumergidas rápidamente en la emulsión líquida LM1 de Amersham de acuerdo al protocolo del fabricante (previamente se calentó la emulsión a 41°C y el procedimiento fue realizado en la oscuridad). Al final de período de exposición, se revelaron los autoradiogramas en D19b (2 minutos con 30 segundos a 20°C) y los radiogramas fueron fijados en una solución de tiosulfato de sodio al 30% por 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron enjuagadas rápidamente en agua destilada y otra vez teñidas con 1/1000 de azul de toluidina. Posteriormente, los portaobjetos fueron secados y montados con el medio Permount. El radiomarcado fue cuantificado usando un microscopio y el sistema de cuantificación Biocom.

2.6 Controles

El primer control consiste en reemplazar la ribosonda antisentido con la ribosonda sentido. Es control con la sonda sentido es necesario para probar la especificidad de marcado. El marcado debe desaparecer completamente. Las secciones control con ARNasa son obtenidos mediante la adición y un paso de preincubación con 10 µg/ml ARNasa A previo a la hibridación. La ausencia de unión luego del tratamiento RNasa indica que la unión producida en las muestras fue debida solamente a la presencia de ARN dentro de los tejidos.

3. Resultados y Discusión.

Los análisis realizados en el presente trabajo describen los métodos utilizados y previamente adaptados para la detección de transcritos (ARNm) de péptidos antimicrobianos de *Penaeus vannamei*.

Los materiales biológicos deben ser fijados para preservar la morfología de los tejidos de interés a ser analizados. Desde un punto de vista químico, existe limitación en el tipo de fijadores usados debido a que el ARN es pobremente reactivo a los agentes de crosslinking. Sin embargo, las secuencias objetivo de ADN o ARN están rodeadas por proteínas y un

extensivo crosslinking de estas proteínas enmascara los ácidos nucleicos objetivos para su detección. Desafortunadamente, un protocolo de fijación el cual pueda ser usado para todos los substratos no ha sido descrito. La fijación y los protocolos de pre-tratamiento deben ser optimizados para cada detección. Nuestras observaciones son consistentes en que las fijaciones basadas formalina o inmersiones en una solución en 4 % de paraformaldehído fueron exitosas.

Para procesar la hibridación *in situ* sobre cortes histológicos de tejidos invertebrados, no solamente es necesario fijar los tejidos, sino también embeber dichos tejidos en parafina. Este hecho, se encuentra fundamentado en que los invertebrados son organismos altamente heterogéneos y las secciones de tejidos fijados embebidos en parafina, según nuestro trabajo, ofrecen la mejor morfología para su observación al microscopio.

Para evitar ruido de fondo no específico cuando enzimas son usadas como reveladores, debido a actividad endógena de estas enzimas, se debe inactivar dicha actividad enzimática. En nuestro trabajo usamos con éxito el tratamiento con 1 % de H₂O₂ disuelto en metanol por 30 minutos para inhibir a la peroxidasa endógena. En lo que concierne al uso de la fosfatasa alcalina, la inhibición de la fosfatasa endógena fue lograda exitosamente utilizando levamisol añadido en la solución de sustrato. Sin embargo, debemos notar que el uso de los cromógenos (NBT y BCIP) usados para revelar la fosfatasa alcalina tiñen de azul la cutícula de los camarones.

El tratamiento con proteinasa K sirve para incrementar la accesibilidad de la sonda nucleica a las secuencias objetivo mediante la digestión de las proteínas que rodean el ARNm objetivo. La pepsina también ha sido utilizada y generado excelentes resultados para secciones de tejido fijados con formalina y embebidos en parafina. Nuestras observaciones demostraron que los tratamientos con proteinasa K deben ser evitados para secciones de células citocentrifugadas, debido a que la accesibilidad a la secuencia objetivo es buena. Además el tratamiento con proteinasa K en células citocentrifugadas es muy riguroso y genera el desprendimiento de gran parte de dichas células adheridas al portaobjetos con citocentrifugación. Las sondas marcadas también se pueden hibridar no específicamente a secuencias las cuales son parciales pero no completamente homologas a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables que los híbridos que encajan perfectamente con la secuencia de la sonda. Ellas son usualmente disociadas por lavados de varias astringencias (revisar en sección 2.1). La astringencia de los lavados

pueden ser manipulados variando la concentración de formamida, la concentración de sal y la temperatura. En general, la mayor especificidad es obtenida cuando la hibridación es realizada a alta astringencia y los lavados son fuerte o pobremente astringentes, más que hibridando a baja astringencia y lavando con alta astringencia.

Los tratamientos con ARNasa sirven para remover el RNA. Este tratamiento puede ser usado: i) como control en hibridaciones con ARNm como objetivos (ver controles en la figura 1) y ii) para remover la ribosondas no hibridadas de esta forma reducir el ruido de fondo de la tinción. Este hecho se fundamenta en que los híbridos RNA-RNA son muy termoestables y resistentes a la digestión con ARNasa permitiendo la digestión de las sondas de ARN parcialmente hibridadas.

Existen dos tipos de métodos de hibridación no radioactiva, los directos e indirectos. En el método directo, la molécula detectada (reportero) está en unión directa con el ácido nucleico utilizado como sonda, de esta forma los híbridos sonda y ARN objetivo pueden ser visualizados al microscopio inmediatamente después de la reacción de hibridación (Figura 1 D y E). Para los métodos directos, es esencial que los reporteros de la sonda sobrevivan las duras condiciones de hibridación y lavado. Además, es también muy importante que la molécula reportero no interfiera con la reacción de hibridación. En esta forma algunas compañías han producido nucleótidos marcados con fluorocromos, los cuales pueden ser usados para la detección directa para la fabricación de sondas de ADN y ARN. Los métodos directos son usados frecuentemente para mostrar evidencia de anomalías genómicas con sondas ADN fluorescentes, FISH fluorescent *in situ* hybridization [11, 12]. Los procedimientos realizados con marcadores radioactivos permiten la cuantificación de la cantidad de ARN objetivo (Figura 1 F).

Los procedimientos indirectos requieren que la sonda nucleica contenga una molécula reportera, introducida química o enzimáticamente, que puede ser detectada por histoquímica de afinidad. Una vez más la presencia del marcado no debe ser interferida con la reacción de hibridación o la estabilidad debe híbrido resultante. La molécula reportera se estar accesible para los anticuerpos. Un número de modificaciones de haptenos han sido descritos [13, 14, 15]. Los sistemas más populares son los sistemas biotina-streptavidina y el sistema digoxigenina. El presente trabajo se concentra en los métodos indirectos usando digoxigenina detectados con anticuerpos específicos.

El sistema digoxigenina fue desarrollado y continúa siendo expandido por Boehringer Mannheim actualmente Roche [16, 17]. El método de marcado con digoxigenina se basa en un esteroide aislado de plantas digitales. Tanto las flores como las hojas de estas plantas son la única fuente natural de digoxigenina, el anticuerpo anti-digoxigenina no se adhieren a ningún otro material biológico. La digoxigenina está usualmente unida en la posición C-5 de los nucleótidos uridina mediante la vía de un brazo espaciado que contiene once átomos de carbono. Los nucleótidos marcados con digoxigenina pueden ser incorporados dentro de las sondas de ácidos nucleicos mediante ADN polimerasas (*Escherichia coli* ADN polimerasa I, T4 ADN polimerasa, T7 ADN polimerasa, transcriptasa reversa y Taq ADN polimerasa) además se puede utilizar ARN polimerasas (Sp6, T3 o T7 ARN polimerasas) y transferasas terminales. Así, la señal de digoxigenina puede ser añadida por marcado por iniciado aleatorio (random priming), corte de traducción (nick translation), terminación de cola 3', o transcripción *in vitro*. Los protocolos descritos en la sección materiales y métodos en este artículo, establecen la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina mediante el método de transcripción *in vitro*.

Para la utilización del método de la transcripción *in vitro*, el ADN a ser transcrito debe ser clonado dentro de un sitio de múltiple unión (polylinker site) de un vector que contiene la secuencia promotora para Sp6, T7 o T3 ARN polimerasas (pGem vector). Así, las sondas de ARN son generadas por transcripción *in vitro* de fragmento linealizado del ADN molde. La síntesis es usualmente completada después de 1 a 2 horas. Los transcritos sintetizados son una copia exacta de la secuencia desde el promotor

hasta el sitio de restricción usado para la linearización. En esta forma, el tamaño de la sonda puede ser ajustado por la elección de la enzima de restricción para la linearización y las sondas tienen todas, la misma longitud. La sondas de ARN son de simple cadena y la cantidad de sonda de ARN marcada no radioactivamente es de 10 µg por cada 1 µg de ADN molde.

En nuestras experiencias, las sondas marcadas con digoxigenina son detectadas con anticuerpos de alta afinidad anti-digoxigenina (Figura 1 A, B y C). Tales anticuerpos puede estar también conjugados a la peroxidasa, fluoresceína, rodamina, AMCA o al oro coloidal. La sensibilidad de la detección depende del método usado para visualizar el conjugado del anticuerpo anti-digoxigenina. Cuando se utiliza anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a la fosfatasa alcalina usando como sustrato NBT y BCIP, la sensibilidad de la reacción de detección es rutinariamente de 0.1 pg (en Southern blot)

Una ventaja de este método de detección colorimétrico son las buenas propiedades de localización, alta sensibilidad y estabilidad del precipitado. Además, siempre es necesario determinar el tiempo de reacción para evaluar la proporción de la señal de ruido de fondo. Esta, señal no específica puede ser monitoreada durante la reacción enzimática.

Las sondas de simple cadena proveen ciertas ventajas: i) la ausencia de reacción de competencia durante la hibridación *in situ* al contrario de las sondas de doble cadena. ii) la fuerza de unión entre la sonda y su secuencia objetivo alcanza su máximo con los híbridos ARN-ARN. Así, las condiciones de hibridación son diseñadas a favor de la formación de híbridos ARN-ARN.

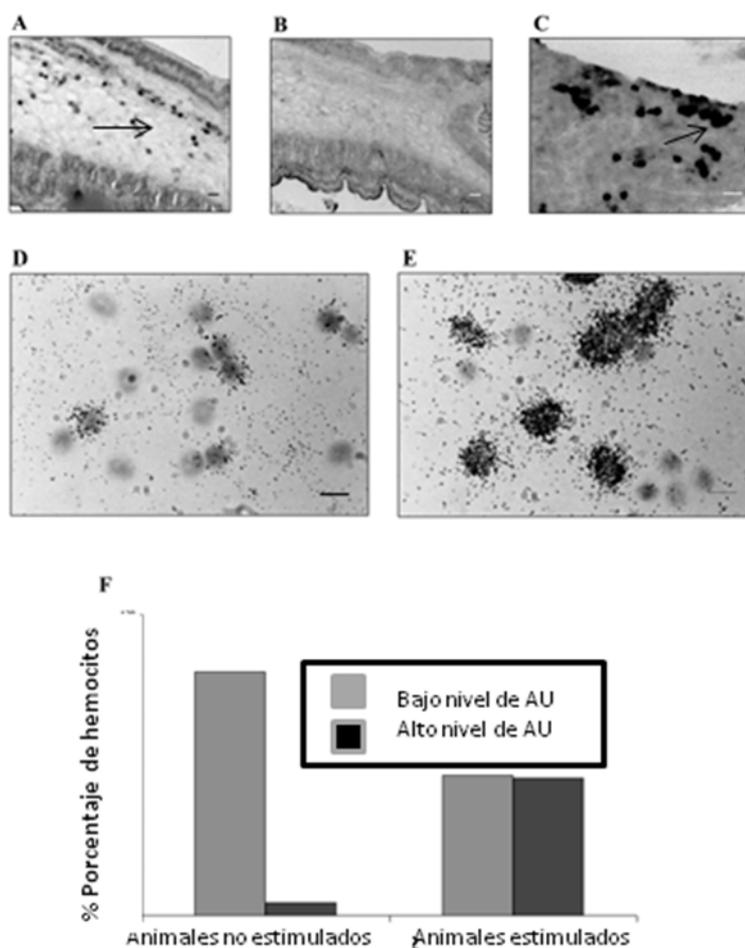


Figura 1. Detección de ARN de penaeidins en camarones por hibridación *in situ*. (A y C, flechas) Secciones embebidas en parafina de camarones que fueron hibridadas con ribosondas antisentido de penaeidins marcadas con DIG-UTP y reveladas usando anticuerpos conjugados con la fosfatasa alcalina. El marcado es observado en los hemocitos circulantes (A, flecha) y en muchos tejidos el marcaje es particularmente obvio en los nódulos epigástrico hematopoyético también llamado órgano linfoide. La forma de las células positivas en este tejido parecen hemocitos infiltrantes. (B) Control negativo, donde los cortes histológicos fueron hibridados con sondas sentido, ningún marcaje es observado. (D, E) Hemocitos citocentrifugados fueron hibridados con ribosondas penaeidins antisentido marcado con ^{35}S -UTP. El contenido de ARNm de penaeidins en los hemocitos citocentrifugados fue visualizado por granos de plata resultado del contacto de la emisión del ^{35}S con emulsión autoradiográfica. Los granos de plata son observados en hemocitos de animales no estimulados (D), compartivamente, después de 72 horas de un desafío microbiano, señales más fuertes son observados en algunos hemocitos (E). (F) Titulación de hemocitos individuales del nivel de expresión fue realizado usando el sistema Biocom. Los resultados son expresados en unidades arbitrarias (UA). El nivel de expresión fue cuantificado en 25 células por cada portaobjeto y 5 portaobjetos fueron evaluados por camarón y cada valor representa el promedio de 4 camarones. Los histogramas se refieren al porcentaje de los hemocitos que exhiben mas de 50 UA (barras oscuras) y el porcentaje de hemocitos presentando menos de 50 UA (barras grises)

4. Conclusiones

El presente trabajo describe adaptaciones a métodos para la detección y localización de ARN mensajeros de penaeidins, péptidos antimicrobianos del camarón *Penaeus vannamei*. Se optimizaron protocolos para realizar la hibridación *in situ* tanto sobre células como sobre tejidos incluidos en parafina utilizando marcadores

fríos. Además, fueron también optimizados protocolos para la detección de ARNm de penaeidins tanto sobre células citocentrifugadas como sobre tejidos previamente incluidos en parafina mediante el uso de marcadores no radioactivos y radioactivos. El presente trabajo es una contribución para el estudio de la expresión de efectores del sistema inmune de los camarones y otros invertebrados.

5. Referencias

- [1] Pardue M.L., Gall J.G., 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 64, 600-604.
- [2] John H., Birnstiel M., Jones K., 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature., 223, 582-587
- [3] Rabin M., Watson M., Barker P.E., Ryan J., Breg W.R., Ruddle F.H., 1984. N-ras transforming gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by *in situ* hybridization. Cytogenet. Cell Genet., 38, 70-72.
- [4] Schroeder W.T., Lopez L.C., Harper M.E., Saunders G.F., 1984. Localization of the human glucagon gene (GCG) to chromosome segment 2936-37. Cytogenet. Cell Genet., 38, 76-79.
- [5] Harper M.E., Marselle L.M., Gallo R.C., Wong-Stahl F., 1986. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotrophic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 772-776.
- [6] Coghlan J.P., Aldred P., Haralambidis J., Niall H.D., Penshow J.D., Tregear G.W., 1985. Hybridization histochemistry. Anal. Biochem., 149, 1-28.
- [7] 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. Eur. J. Biochem., 269, 2678-2689.
- [8] Muñoz M., Vandenbulcke F., Gueguen Y., Bachère E., 2003. Expression of antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. Dev. Comp. Immunol. In press.
- [9] Bachère E., Chagot D., and Grizel H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. Dev. Comp. Immunol., 12, 549-559.
- [10] Hasson K.W., Hasson J., Aubert H., Redman R.M., Lightner D.V., 1997. A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. Journal of Virological Methods, 66, 227-236.
- [11] Moter A., Gobel U.B., 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods, 41(2), 85-112.
- [12] Miny P., Tercanli S., Holzgreve W. 2002. Developments in laboratory techniques for prenatal diagnosis. Curr. Opin. Obstet. Gynecol., 14(2), 161-168.
- [13] Hopman A.H.N., Wiegant J., Tesser G.I., Van Duijn P., 1986. A nonradioactive *in situ* hybridization method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. Nucleic acids Res., 14, 6471-6488.
- [14] Hopman A.H.N., Wiegant J., Van Duijn P., 1987. Mercurated nucleic acid probes, a new principle for nonradioactive *in situ* hybridization. Exp. Cell Res., 169, 357-368.
- [15] Raap A.K., Hopman A.H.N., Van der Ploeg M., 1989. Use of hapten modified nucleic probes in DNA *in situ* hybridization. Techniques Immunocytochem., 4, 167-197.
- [16] Kessler C., 1990. The digoxigenin system: principle and applications of the novel nonradioactive DNA labeling and detection system. Bio Technology Int., 1990, 183-194.
- [17] Hölftke H.J., Sagner G., Kessler C., Schmitz G., 1992. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its applications. Bio Techniques., 12 (1), 104-114.