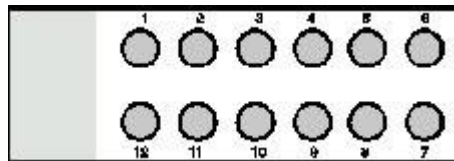


Aplicación de láminas portaobjetos adhesivos

A) Principio

1.

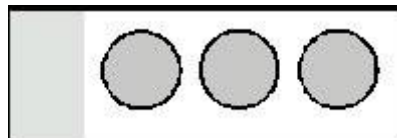
Un nuevo método de investigación usa láminas porta-objetos con campos preparados de reacción (CR) para anclar células vivas en la superficie de vidrio. Estas células no pierden ni sus antígenos ni sus funciones.



2.

Las láminas porta-objetos adherentes tienen dos funciones:

- a) 3 ó 12 campos de reacción en cuyas superficies de vidrio se anclan las células
- b) la capa hidrofóbica encerrando los campos de reacción (CR) es muy eficaz en rechazar permanentemente soluciones de proteína aun muy concentradas. La capa hidrofóbica impide una mezcla de soluciones entre los campos individuales de reacción a pesar de que la lámina porta-objetos se agita con el mezclador Vortex.



3.

Todos tipos de células pueden ser examinadas:

- a) todas células en la sangre, como linfocitos, monocitos, granulocitos, trombocitos y eritrocitos;
- b) células de médula ósea, efusiones, fluido cerebroespinal, lavaje bronquioalveolar, y suspensión de células de aspirado de ganglios linfocitos y tumores.

4.

El examen ya se lleva a cabo con pocas células. En general se usan 20,000 a 50,000 células.

5.

El volumen de sustrato de incubación es pequeño; 5 a 10 μ l es suficiente para cubrir un CR.

6.

Lavar de las células es fácil, con agua corriente lavar el CR con un medio adecuado. Ello ahorra

laboriosos centrifugados y previene la pérdida de células.

7.

Las células vivas se pueden aplicar y examinar para muchos empleos y estudios. Pueden ser fijadas con diferentes fijadores en soluciones acuosas o se pueden ser secadas y después fijadas.

B) La preparación de la lámina porta-objetos adherente

1.

Los campos de reacción de la lámina porta-objetos adherente están cubiertos para proteger la adhesión electrostática. Cubiertos con la capa de protección sobre los CR se puede almacenar las láminas porta-objetos en temperatura ambiente durante unos años.

2.

El color de CR se diluye con agua corriente y se lava, luego se libera de residuos con una solución tampón isotónica: NKH. En los CR se queda una película invisible, cuya carga positiva causa la adhesión electrostática de las células cargadas negativamente.

3.

Para evitar un resecamiento de los CR, se trabaja en la cámara húmeda.

4.

Una adhesión visible de las células está garantizada:

- a) cuando las células son vitales, es decir, no dañadas
- b) si la aplicación de las células lavadas se realiza en una solución tampón fisiológica libre de proteínas

5.

Una adhesión celular insuficiente y la pérdida de células pueden ser causadas por diferentes factores:

- a) El color verde en los CR no se ha quitado apropiadamente. Lavar con agua completamente y enjuagar con solución tampón NKH. No dejar que los CR se sequen.
- b) Deterioro mecánico del recubrimiento en los CR, p.ej. con la punta de una pipeta ó por limpiar con un trapo.
- c) La suspensión celular no estuvo completamente libre de proteínas. A causa de proteínas solubles se neutraliza el recubrimiento de los CR. Por eso las células se tienen que lavar minuciosamente en una solución tampón NHK sin añadidura de proteínas. Las células se deberían aplicar inmediatamente después del aislamiento y del lavado
- d) Las células están dañadas. Un deterioro de las células puede ser causado por almacenamiento de mucho tiempo, solución tampón no fisiológica, un choque de temperaturas a causa de medios fríos. Células dañadas se adhieren mal. En caso de su destrucción, éstas pueden liberar sustancias que pueden impedir la adhesión de otras células. Las células muertas se tienen que separar.

La adhesión electrostática de las células en la lámina port-objetos es tan estable que los CR pueden ser lavados en una cubeta o cuidadosamente con un frasco lavador sin peligro de pérdida de células.

C) Posibilidades de aplicación de la lámina porta-objetos adherente

- Prueba PAP para inmunoperoxidasa ó pruebas comparables de enzimas
- Método de inmunofluorescencia u otras marcaciones comparables de superficies celulares
- Coloración de las células según Pappenheim (Morfología)
- Verificación intracelular de antígenos
- Método biológico molecular, p.ej. FISH

D) Seleccionada lista de referencia

Bross KJ, et. al.

Demonstration of cell surface antigens and their antibodies by the peroxidase-antiperoxidase method
Transplantation 25: 331-334 (1978)

Andreesen R, et. al.

A Hodgkin cell-specific antigen is expressed on a subset of auto- and alloactivated T (helper) Lymphoblasts
Blood 63: 1299-1302 (1984)

Schneider H, et. al.

Identification of proliferating lymphocyte subpopulations in microcultures by surface marker and autoradiography
Immunological Communications
13:553-561 (1984)

Frickhofen N, et. al.

Modified immunocytochemical slide technique for demonstrating surface antigens on viable cells
J of Clinical Pathology 38: 671-676 (1985)

Guzman J, et. al.

Tuberculous pleural effusions lymphocyte phenotypes in comparison with other lymphocyte-rich effusions
Diagnostic Cytopathology 5: 139-144 (1989)