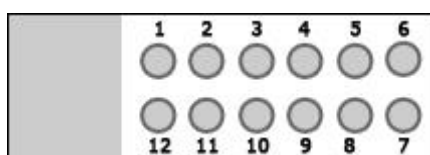




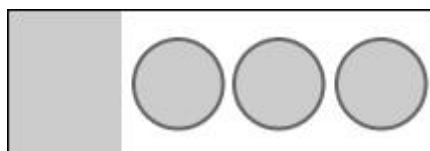
Aplicación de las Láminas portaobjetos adhesivos

1) Principio

- a) Una nueva técnica para la investigación de células vivas emplea porta-objetos con campos de reacción preparados para anclar las células duraderamente en la superficie del vidrio. En este proceso las células no pierden ni su antigenidad ni su funcionalidad.



- b) Las láminas porta-objetos adhesivos tienen dos unidades de función:
- i) 3 o 12 campos de reacción en cuyas superficies de vidrio las células son ancladas.
 - ii) Una capa hidrofóbica que rodea los campos de reacción. Esta repele duraderamente cualquier solución de proteína incluso de alta concentración. La capa hidrofóbica impide una mezcla de soluciones entre los diferentes campos de reacción incluso si el porta-objeto se agita con un agitador Vortex.



- c) Todo tipo de células pueden ser investigados:
- i) todas las células de sangre, como linfócitos, monócitos, granulócitos, trombocitos y eritrócitos
 - ii) células de tuétano, efusiones, fluido cerebroespinal, lavaje bronquioalveolar, y suspensiones de las células de los ganglios linfáticos y de tumores
- d) Para realizar dichas investigaciones solamente son necesario pocas células. Generalmente se usan entre 20.000 y 50.000 células.
- e) El volúmen del substrato para la incubación es pequeño; entre 5 y 10 μ l son suficientes para cubrir uno de los campos de reacción.
- f) Las células pueden ser fácilmente lavados ya que se puede enjuagar los campos de reacción con el respectivo medio. Así se puede ahorrar el tiempo del centrifugado y además evitar la pérdida de células.



- g) Se pueden utilizar células vivas para numerosas aplicaciones y estudios. Pueden ser fijadas en soluciones acuosas con diferentes medios de fijación o bien pueden ser secadas y seguidamente fijadas.

2) La preparación de las láminas porta-objetos adhesivos

- a) Los campos de reacción de las láminas porta-objetos adhesivos llevan una verde capa para proteger el efecto adhesivo. Con esta capa protectora los porta-objetos pueden ser guardados durante un año en temperatura ambiente.
- b) Primero hay que disolver esta capa protectora con agua corriente. Seguido hay que enjuagar el porta-objeto y después hay que liberarlo de cualquier tipo de residuos mediante un tampón isotónico. Una capa invisible queda en la superficie de los campos (recubrimiento adhesivo) cuya carga positiva fija las células negativamente cargadas.
- c) Para evitar que los campos de reacción se sequen, el proceso se realiza en una cámara húmeda.
- d) Una visible adhesión de las células está garantizada si
- i) las células son viables, es decir, no deben estar dañadas y
 - ii) la aplicación de las células lavadas se realiza en un tampón fisiológico libre de proteínas.
- e) Una adhesión insatisfactoria o una pérdida de células pueden ser causadas por los siguientes factores:
- i) El recubrimiento verde no se quitó del todo. Enjuague el porta-objeto enteramente con agua y seguido con el tampón isotónico. Asegúrese de que los campos de reacción no se sequen.
 - ii) Daños mecánicos del recubrimiento adhesivo; hay que evitar el deterioro por puntas de pipetas o por limpieza inadecuada.
 - iii) La suspensión celular no está completamente libre de proteínas. Proteínas solubles neutralizan la capa adhesiva. Anteriormente hay que lavar las células cuidadosamente en un tampón isotónico libre de proteínas. Deben utilizarse las células inmediatamente después del aislamiento y del lavado.
 - iv) Las células están dañadas. Un deterioro de las células puede ser causado por largos tiempos de almacenamiento, empleado de tampones no-fisiológicos o un choque de temperatura. Células dañadas o muertas son difíciles de anclar. Células dañadas pueden segregar sustancias que impiden la adhesión de otras células. Por eso las células muertas tienen que ser eliminadas.

La adhesión electrostática de las células en las láminas port-objetos es tan estable que los campos de reacción pueden ser lavados en una cubeta o con una jeringa sin riesgo alguno de pérdida de células.



3) **Aplicación de las láminas porta-objetos adhesivos**

- a) Prueba de inmunoperoxidasa-PAP o comparables pruebas de enzimas
- b) Método de inmunofluorescencia u otros métodos comparables
- c) Teñido de células mediante el método Pappenheim (morfología)
- d) Verificación intracelular de antígenos
- e) Método biológico molecular, p.ej. FISH

4) **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)