

Contribución de la inmunofluorescencia al estudio de las nefropatías glomerulares

Alberto Torras Rabasa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

CONTRIBUCION DE LA INMUNOFLORESCENCIA AL ESTUDIO
DE LAS NEFROPATIAS GLOMERULARES

por Alberto TORRAS RABASA

LOS REFINADOS DE AZÚCAR

ANEXO III

El azúcar refinado es el que se obtiene al someter el azúcar de caña a un proceso de refinación que consiste en la eliminación de las impurezas y la cristalización del azúcar en forma de cristales blancos.

PARTE PRACTICA

El refinado del azúcar de caña se realiza en varias etapas: primero se extrae el jugo de la caña, luego se clarifica el jugo para eliminar las impurezas, se cristaliza el azúcar y finalmente se obtienen los cristales de azúcar refinado.

En el presente se describen los procedimientos para la obtención de los cristales de azúcar refinado a partir del jugo de caña. El proceso comienza con la extracción del jugo de la caña, que se realiza mediante el uso de molinos. El jugo obtenido se somete a un proceso de clarificación para eliminar las impurezas y el color. Posteriormente, el jugo clarificado se somete a un proceso de cristalización, donde se agregan sustancias que ayudan a la formación de los cristales de azúcar. Finalmente, los cristales obtenidos se someten a un proceso de secado y empaque para su comercialización.

LAS TECNICAS DE INMUNOFLORESCENCIA EN LA DEMOSTRACION DE
LAS REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO

Definición: La inmunofluorescencia es un procedimiento utilizado tanto en inmunología como en histología para evidenciar la fijación de anticuerpos sobre un antígeno precisando además su localización gracias al marcado previo del anticuerpo con una sustancia fluorescente, que además no altera su especificidad. La reacción antígeno-anticuerpo es entonces fácilmente visible gracias al microscopio de fluorescencia.

Historia: La fijación de diversos radicales a anticuerpos fue estudiada hace tiempo por diversos autores (Hopkins 1933, Marrack 1934 y Eagle 1936) para observar las modificaciones que sobre la actividad de los anticuerpos ejercían dichos radicales. Coons y Kaplan en 1941 fueron los primeros que concibieron la idea de utilizar un fluorocromo como marcador de anticuerpos, primero se utilizó el beta antraceno pero dado que emitía una fluorescencia semejante a la autofluorescencia tisular, se reemplazó al año siguiente por la fluoresceína.

Hasta 1955 la inmunofluorescencia había sido un privilegio de ciertos laboratorios bien equipados, capaces de realizar la síntesis del isocianato de fluoresceína, para lo que se precisaba la hidrogenación catalítica y sobre todo el empleo del fosfógeno tóxico; era preciso disponer también del conjunto de una fuente de luz rica en radiaciones ultravioletas (U.V.) y los instrumentos ópticos necesarios para la realización de un microscopio de fluorescencia, preparación de anticuerpos fluorescentes y los cortes tisulares con preservación de su actividad antigénica.

Actualmente las mejoras técnicas y las facilidades aportadas por la fabricación industrial del material así como la posibilidad de obtener los antiseros marcados de laboratorios dignos de confianza hace posible la utilización de la inmunofluorescencia co-

mo técnica de rutina.

La inmunofluorescencia a la vez que permite reconocer una reacción antígeno-anticuerpo establece la topografía histológica de dicha reacción. Veamos a continuación el principio de la técnica de inmunofluorescencia de Coons y Kaplan:

- 1º) Un producto fluorescente se une a un anticuerpo
- 2º) El reactivo se aplica a un corte histológico
- 3º) Los lugares de fijación de los anticuerpos marcados son revelados gracias a su fluorescencia (emisión de luz visible cuando son excitados por la luz U.V.

4º) Se interpretan entonces los antígenos así localizados; p. ej. la presencia de inmunoglobulinas sugiere la presencia de anticuerpos.

Hay tres formas generales según las cuales se puede efectuar la prueba:

a) Prueba directa. El anticuerpo contra el sustrato de tejido es conjugado con el fluorocromo y aplicado directamente. Por ejemplo, supongamos que deseamos mostrar la distribución tisular de un autoantígeno gástrico que reacciona con los anticuerpos de un paciente con anemia perniciosa. Aislamos IgG del suero del paciente, lo conjugamos con fluoresceína y lo aplicamos a un corte de mucosa gástrica humana; observando esta preparación con el microscopio U.V. podemos ver el citoplasma de las células parietales fluorescente.

Otro modo de aplicación de esta técnica es la inmunofluorescencia renal en la que anticuerpos anti gammaglobulina o anti C3 humanos marcados con fluoresceína evidencian en una biopsia renal a estudiar la fijación de inmunoglobulinas o C3.

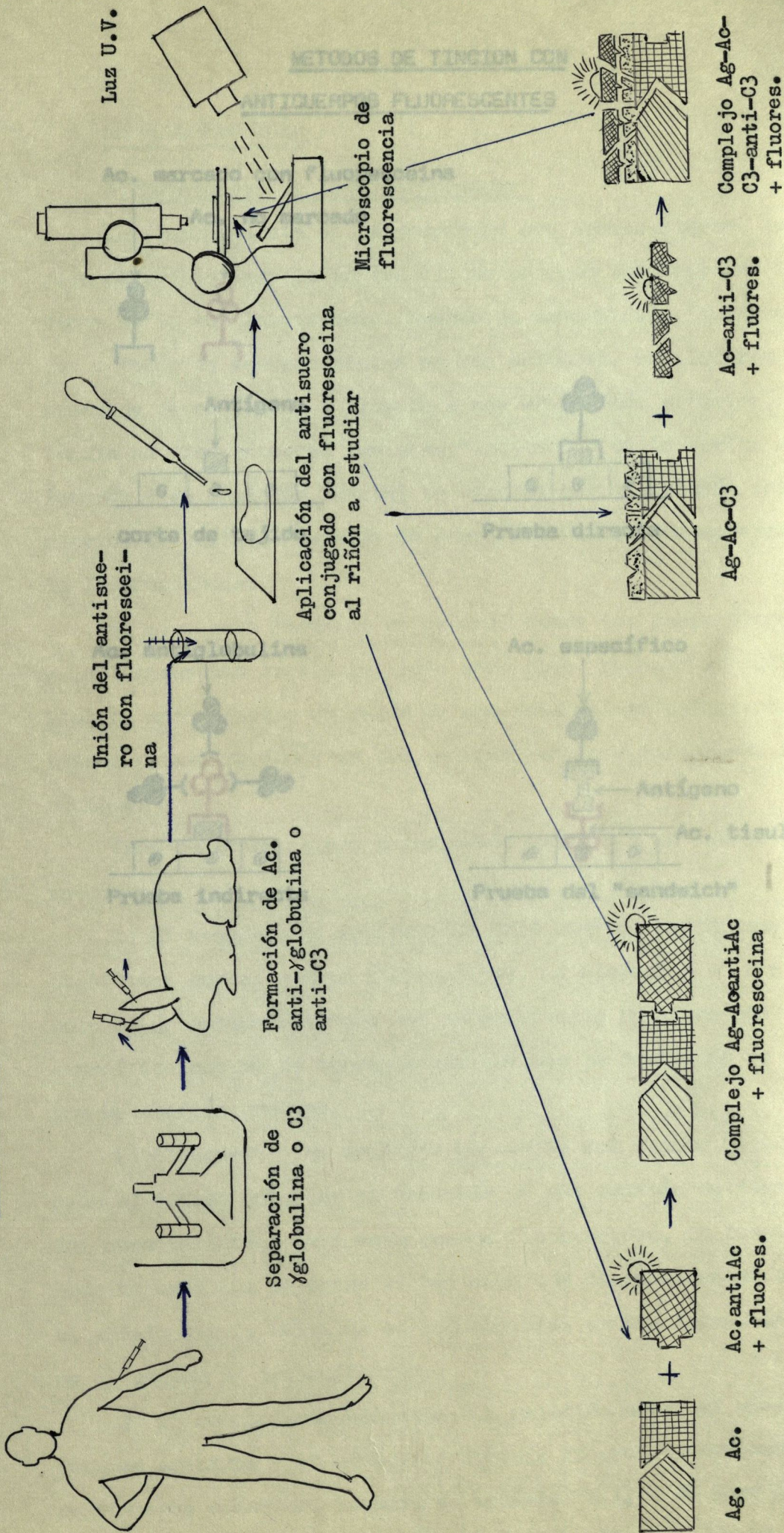
b) Prueba indirecta. El anticuerpo no marcado se aplica directamente al sustrato de tejido y se hace visible tratándolo con un suero antiglobulina inmune conjugado con fluorocromo. Siguiendo el ejemplo anterior podemos aplicar la prueba indirecta para saber si el paciente tiene anticuerpos contra las células parie-

tales gástricas. Primero se enfrenta el corte de estómago con el suero del paciente, después de lavar bien se aplica suero anti-globulina humana de conejo marcado con fluoresceína; si el suero del paciente contenía anticuerpos contra las células parietales gástricas, dichos anticuerpos se habrán fijado en el estómago y a ellos se fijará la antiglobulina marcada que los revelará.

c) Prueba del "Sandwich"

Este es un procedimiento de doble capa, diseñado para visualizar anticuerpos específicos. Si por ejemplo quisieramos ver cuantas células de una preparación de tejido linfóide estaban sintetizando anticuerpos contra el polisacárido del neumococo, primero se fijan las células con etanol para impedir que el anticuerpo sea arrastrado por los lavados de la prueba, se trata entonces con una solución de antígeno polisacárido. Después de lavar se aplica anticuerpo polisacárido marcado con fluoresceína para localizar las células que habían fijado específicamente el antígeno y con ello se infiere la síntesis de dicho anticuerpo en esta célula.

PRINCIPIOS Y TECNICA DE LA INMUNOFLORESCENCIA



METODOS DE TINCION CON ANTICUERPOS FLUORESCENTES

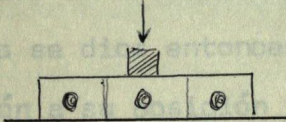
Ac. marcado con fluoresceína



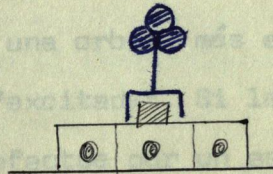
Ac. no marcado



Antígeno

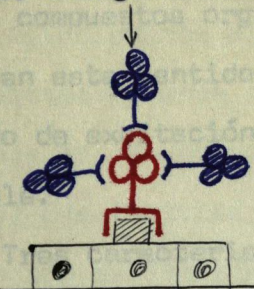


corte de tejido



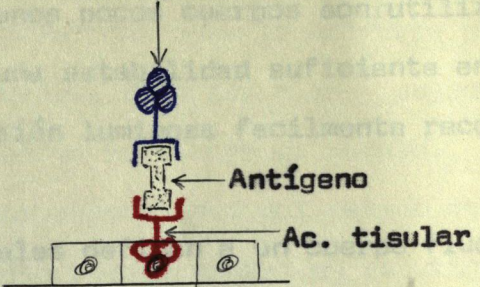
Prueba directa

Ac. antiglobulina



Prueba indirecta

Ac. específico



Prueba del "sandwich"

1) El espectro de excitación: Sólo ciertas radiaciones son absorbidas por el cuerpo fluorescente. La elevación de una molécula de un estado básico a uno de excitación requiere una energía específica que no se consigue mas que con la absorción de un quantum de energía precisa.

2) El espectro de emisión: La vuelta al estado de excitación al estado anterior se acompaña de una emisión de fotones de luz característica para cada cuerpo fluorescente, la longitud de onda de esta luz es única si hay sólo una posibilidad de vuelta al estado base y múltiple si son posibles varias formas de retorno al estado de preexcitación.

3) El rendimiento cuántico: La relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos define el rendimiento cuántico. Siempre es inferior a 1, 0.55 para la fluorescencia.

LA FLUORESCENCIA

A) Naturaleza de la fluorescencia

La fluorescencia es la propiedad que poseen ciertas sustancias de emitir bajo la influencia de un rayo luminoso una luz distinta de la que las irradia. Cuando un determinado "quantum" de luz o fotón de energía incide en una molécula, un electrón es arrancado de su orbita y llevado a una orbita más exterior, la molécula se dice entonces que está "excitada". Si la vuelta del electrón a su posición inicial se efectúa por un estadio intermedio, se emite un quantum de energía inferior que caracteriza la fluorescencia.

Si bien este fenómeno es general desde los gases elementales a los compuestos orgánicos, sólo unos pocos cuerpos son utilizables en este sentido en razón de una estabilidad suficiente en estado de excitación y de una emisión luminosa fácilmente reconocible.

Tres características principales definen a un cuerpo fluorescente:

1) El espectro de excitación: Sólo ciertas radiaciones son absorbidas por el cuerpo fluorescente. La elevación de una molécula de un estado básico a uno de excitación requiere una energía específica que no se consigue mas que con la absorción de un quantum de energía precisa.

2) El espectro de emisión: La vuelta del estado de excitación al estado anterior se acompaña de una emisión de fotones de luz característica para cada cuerpo fluorescente, la longitud de onda de esta luz es única si hay sólo una posibilidad de vuelta al estado base y múltiple si son posibles varias formas de retorno al estado de preexcitación.

3) El rendimiento cuántico: La relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos definen el rendimiento cuántico. Siempre es inferior a 1, 0'85 para la fluo-

resceina y 0'25 para la rodamina. Los restantes fotones se emiten o bien con una longitud de onda idéntica a la absorbida o bien se pierde colisionando con las moléculas vecinas y seguramente utilizándose en las transformaciones químicas de las moléculas (la energía luminosa transportada por los rayos U.V. y la luz visible es del orden de 35 a 80 Kcal/mol. y es suficiente para crear uniones covalentes.

Numerosos factores influyen en el rendimiento cuántico:

a) La concentración de fluorocromo. A partir de un límite la brillantez de la fluorescencia no es paralela a la concentración del fluorocromo debido a la mayor interacción de las propias moléculas.

b) La intensidad de la excitación puede aumentarse sin modificar notablemente el rendimiento cuántico, pues la molécula está excitada durante un tiempo muy breve, inferior a 10^{-8} segundos y muchas de las moléculas se encuentran en estado de reposo.

c) Los factores ambientales. La estabilidad del estado de excitación es importante para cuerpos fluorescentes en solución donde la colisión entre las moléculas es elevada. El pH del medio influencia grandemente la fluorescencia a consecuencia de los cambios en el equilibrio de ionización de la molécula respecto al solvente. Para la fluoresceina, la fluorescencia es del 50% a pH 6 respecto a un pH de 8. Otros factores tales como la naturaleza del solvente, el estado de agregación de las moléculas fluorescentes, la viscosidad del medio y la temperatura, afectan a la estabilidad del estado de excitación y con ello el rendimiento cuántico.

Así pues la brillantez de la fluorescencia obtenida depende de :

- La intensidad de la luz excitante.
- La cantidad de luz absorbida.
- Rendimiento cuántico.

B) El microscopio de fluorescencia

1) Fuente luminosa: Las lámparas de filamento incandescente emiten un espectro rico en radiaciones visibles e infrarrojas pero pobre en U.V. siendo por ello no aptas para inmunofluorescencia. Para obtener radiaciones ricas en U.V. se utilizan lámparas de arco donde las descargas eléctricas tienen lugar entre electrodos rodeados de un vapor de gas de naturaleza y presión distintas según el tipo.

a) Lámpara de vapor de mercurio a alta presión. Esta potente fuente luminosa de pequeñas dimensiones rica en U.V. y relativamente estable en su intensidad es el material de elección. El espectro de emisión de una lámpara de mercurio tal como la H.B. 200 está constituido por varios picos sobre un fondo continuo muy bajo. La lámpara apagada tiene una presión de mercurio de una atmósfera lo que la hace manejable sin peligro, encendida la presión asciende a 70 atmósferas. La vida media es de unas 200-250 horas con funcionamientos de 2-3 horas; esta vida media se acorta por encendidos frecuentes y cortos. La lámpara puede encenderse inmediatamente después de apagarse, de no ser así la lámpara no puede volver a encenderse hasta transcurridos por lo menos 15 minutos, de lo contrario los electrodos pueden alterarse al estar el mercurio parcialmente vaporizado.

Otros arcos: El de xenón o el de xenón-mercurio funcionan a presiones elevadas tanto encendidas como apagadas siendo por tanto constante el peligro de explosión. El espectro de emisión es más continuo con algunos picos correspondientes al mercurio; se precisan además unos filtros muy selectivos. La fluorescencia suministrada es menor. Las mismas objeciones ofrece la lámpara de Cadmio. El arco de electrodos de carbono abiertos al aire ya no se utiliza.

2) Los filtros: Son dos los sistemas de filtros utilizados en el microscopio de fluorescencia; los filtros de excitación o

primarios, situados entre la fuente de rayos U.V. y el objeto, tienen la misión de dejar pasar únicamente la radiaciones con longitud de onda que "exciten" la fluoresceína; los filtros de supresión o secundarios situados entre el objeto y el observador suprimen los rayos excitadores dejando pasar únicamente las radiaciones emitidas por el cuerpo fluorescente "excitado".

a) Filtros excitadores o primarios: comprende dos filtros:

- El filtro anticalórico: Dado que los filtros que dejan pasar los rayos U.V. también dejan pasar un porcentaje molesto de rojos, debe interponerse este filtro para que el fondo de la imagen permanezca oscuro; es el filtro que más próximo está de la fuente de luz y es el que protege a los demás filtros de calentamientos excesivos.

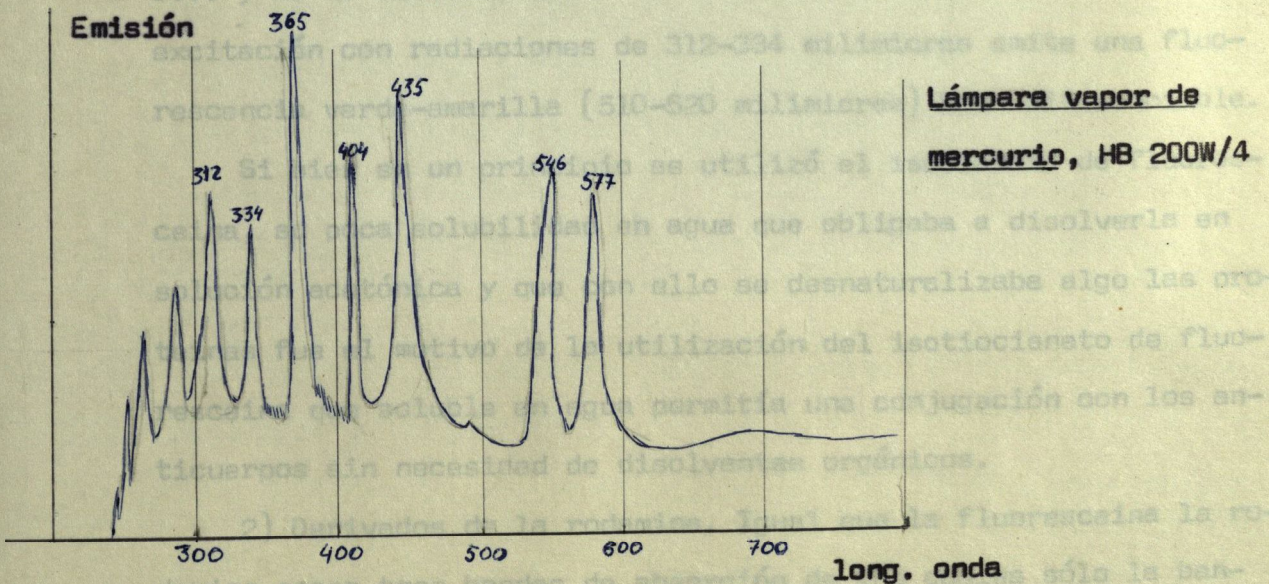
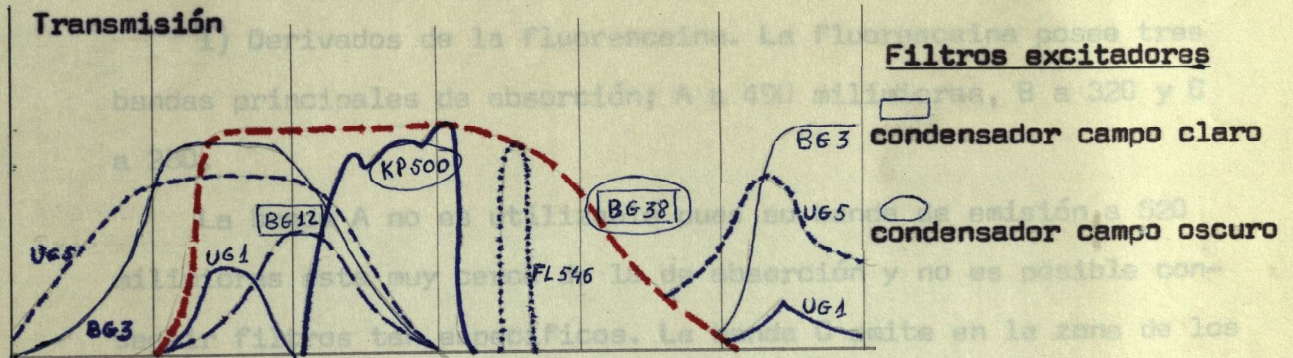
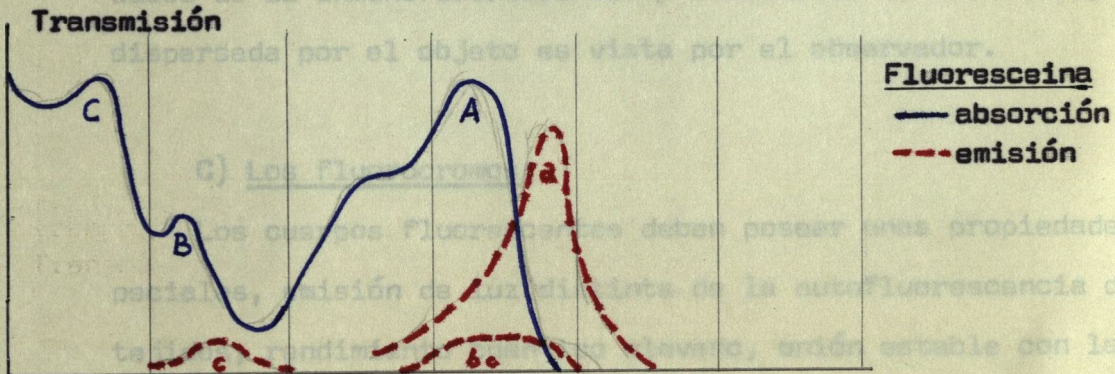
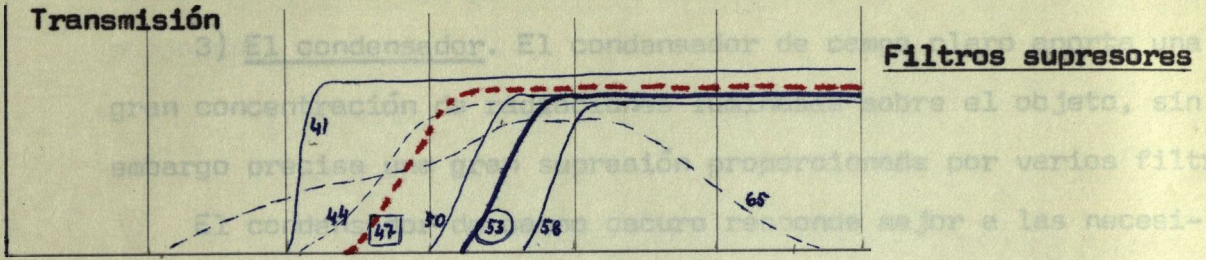
- El filtro de excitación es que no deja pasar más que las radiaciones de excitación, o sea los U.V., si se utiliza fluorescencia en U.V. o el violeta y el azul si se utiliza la fluorescencia azul-violeta.

b) Filtros secundarios o de supresión. Los filtros supresores absorben la luz de excitación de onda corta (p. ej. los U.V.) dejando pasar únicamente la de onda más larga proporcionada por el objeto fluorescente. Estos filtros colocados entre el objeto y el ojo del observador tienen denominaciones (41-44-47-50 y 53) que indican el canto de la transmisión, o sea la longitud de onda a partir de la cual pasan las radiaciones. Así por ejemplo el 470 apenas deja pasar radiaciones por debajo de esta zona, por encima de 470 tiene lugar un rápido aumento de la transmisión que abarca hasta bien entrado el infrarrojo.

Los filtros supresores 41-44-47, más claros, están libres de la molesta fluorescencia propia, en tanto que los 50 y 53 más oscuros pueden fluorescer sensiblemente al ser iluminados directamente con luz de excitación. Este fenómeno se reconoce por un velo rojo que se extiende por toda la imagen (no confundirlo con el

CURVAS DE EMISION Y TRANSMISION DE LA LAMPARA

FILTROS Y FLUORESCENCIA



fondo rojo). Tales perturbaciones se evitan añadiendo siempre un filtro 44 ó 47 a los filtros 50 ó 53.

3) El condensador. El condensador de campo claro aporta una gran concentración de radiaciones luminosas sobre el objeto, sin embargo precisa una gran supresión proporcionada por varios filtros.

El condensador de campo oscuro responde mejor a las necesidades de la inmunofluorescencia y únicamente la luz reflejada o dispersada por el objeto es vista por el observador.

G) Los fluorocromos:

Los cuerpos fluorescentes deben poseer unas propiedades especiales, emisión de luz distinta de la autofluorescencia de los tejidos, rendimiento cuántico elevado, unión estable con la proteína o anticuerpo, etc..

1) Derivados de la fluoresceína. La fluoresceína posee tres bandas principales de absorción; A a 490 milimicras, B a 320 y C a 280.

La banda A no es utilizable pues su banda de emisión a 520 milimicras esta muy cerca de la de absorción y no es posible conseguir filtros tan específicos. La banda C emite en la zona de los U.V. y no es visible. Queda la banda B que aunque con una débil excitación con radiaciones de 312-334 milimicras emite una fluorescencia verde-amarilla (510-520 milimicras) bien diferenciable.

Si bien en un principio se utilizó el isocianato de fluoresceína, su poca solubilidad en agua que obligaba a disolverla en solución acetónica y que con ello se desnaturalizaba algo las proteínas fue el motivo de la utilización del isotiocianato de fluoresceína que soluble en agua permitía una conjugación con los anticuerpos sin necesidad de disolventes orgánicos.

2) Derivados de la rodamina. Igual que la fluoresceína la rodamina posee tres bandas de absorción de las cuales sólo la banda B (350 milimicras) es utilizable por las mismas razones. A esta

banda corresponde una emisi3n de 595 milimicras (amarillo) y otra de 710 milimicras (rojo lejano) que en conjunto da un aspecto anaranjado.

[The following text is extremely faint and illegible due to low contrast and scan quality. It appears to be a list of items or a detailed description, but the characters are not discernible.]

NUESTRA EXPERIENCIA

Nuestras combinaciones de filtros Zeiss utilizando anti-sueros marcados con fluoresceína han sido:

a) Utilizando condensador de campo claro

- Filtros excitadores:

- BG 38, como anticalórico y eliminador del rojo colocado constantemente.

- BG 12, como propiamente excitador.

- Filtro supresor

- 470 milimicras

b) Utilizando condensador de campo oscuro

- Filtros excitadores

- BG 38

- KP 500

- Filtro supresor

- 530 milimicras

La incorporación del nuevo filtro interferencial KP 500 ha supuesto una notable mejoría en las imágenes debido a que sus cantos de transmisión al ser muy perpendiculares dejan pasar unas radiaciones muy bien delimitadas que precisamente caen dentro de la banda A de absorción de la fluoresceína; el filtro de supresión 530 con una curva de transmisión también muy bien delimitada permite el paso único de la banda de emisión de la fluoresceína aún cuando este muy cerca de la banda de absorción. Con el filtro KP 500 la extinción de la fluorescencia es mucho más lenta.

Veamos a continuación unas sugerencias útiles para la mejor obtención de imágenes:

- Se debe operar en un recinto con la iluminación amortiguada.

- El diafragma de luz (entre la lámpara y el condensador) debe estar completamente abierto.

- Unir la lente superior del condensador y el porta-objetos con una gota de aceite de inmersión.
- Si se dispone de objetivo adecuado efectuar inmersión.
- Mejores resultados con objetivos Plan Apocromáticos con diafragma iris.
- Ajustar el sistema Köhler de iluminación.
- Quitar el cristal deslustrado dispersor de la lámpara de fluorescencia.
- De utilizar el condensador de campo oscuro nosotros obtenemos imágenes mas intensas quitando una de las lentes inferiores del condensador.
- Para la obtención de microfotografías nosotros utilizamos un sistema automático de exposición y película Ektachrome EHB de 21 Din. Los tiempos de exposición suelen oscilar entre 2 y 10 minutos.

D) Los antisueros marcados

Si bien en un principio la producción de antisueros adolecían de falta de especificidad, de impurezas, de fluorocromo libre, etc., que obligaban a los diversos centros a fabricarse sus propios antisueros para luego purificarlos y controlarlos personalmente (filtración sobre gel de sephadex, absorción sobre hígado de rata, etc.). En la actualidad la producción de estos antisueros por laboratorios solventes (Hyland, Behring, Pasteur, etc.) hace que los mismos puedan ser utilizados con las máximas garantías. Nosotros utilizamos antisueros Hyland marcados con fluoresceína y efectuamos únicamente controles rutinarios con inmunoelectroforesis y con piezas biopsicas de control.

Fijación difusa no específica

Ciertos reactivos cuando se aplican sobre ciertas preparaciones dan lugar a una fijación difusa del producto fluorescente. La intensidad puede ser suficiente para hacer no interpretable la fluorescencia específica. Este hecho se evita eliminando el fluorocromo libre (filtración en gel de sephadex) y las fracciones anódicas del suero. La fuerza iónica y la alcalinidad del medio diluyente disminuyen algunas de estas fijaciones.

Fijación localizada no específica

Se podría descartar mediante un bloqueo previo con el mismo anticuerpo no fluorescente. El tratamiento previo de los cortes a estudiar con un tampón ácido disminuye la fluorescencia asociada a una unión antígeno-anticuerpo, mientras que persiste la fluorescencia de por ejemplo los túbulos o los cilindros.

Fluorescencia espontánea de las estructuras histológicas

El riñón normal es poco fluorescente. Solamente se evidencia una fluorescencia espontánea notable en las fibras elásticas de las arterias (fluorescencia blanco-azul) y la lipofuscina que hay dentro de las células tubulares, también la media de las arteriolas y los aparatos yuxtaglomerulares pueden presentar una fluores-

cencia naranja.

En los riñones patológicos, la sustancia amiloide y la colágena tienen una fluorescencia azulada pálida. Los cilindros pueden presentar una coloración fluorescente variable, azul, blanca, parduzca.

La mayor parte de las fluorescencias espontáneas tienen pues un color distinto del verde-amarillo propio de la fluoresceína. Sin embargo la distinción de colores con escasa iluminación es difícil ya que la visión escotópica es incolora. Por ello es interesante un examen previo de la preparación sin teñir.

Limites del poder de resolución microscópico en inmunofluorescencia.

La observación de estructuras histológicas a partir de su luz fluorescente difiere de la observación microscópica clásica por luz transmitida. En fluorescencia los objetos emiten radiaciones de luz visible en todas direcciones, el observador puede ver una localización precisa cuando los rayos siguen un curso perpendicular, los rayos emitidos lateralmente iluminan las estructuras vecinas siendo estas las que a su vez y dependiendo de su poder de difracción envían algunos rayos verticalmente, esto hace que una estructura puntiforme pueda verse como un halo luminoso. Este inconveniente es parcialmente resuelto con el empleo de cortes ultrafinos. Sin embargo uno de los inconvenientes teóricos de este último método es el de disminuir la masa de antígeno disponible para que se fijen los anticuerpos fluorescentes, disminuyendo la sensibilidad global de la técnica, por ello los cortes realizados suelen ser de 2 a 5 micras.

Debe tenerse en cuenta también que puede haber una disminución de la emisión luminosa fluorescente a consecuencia de un envejecimiento de la lámpara o de la "extinción" o "gasto" de la fluorescencia ya espontánea (en horas) ya por una excitación continua con rayos U.V. (minutos), por ello las preparaciones deben ser teñidas

y "leídas" sin solución de continuidad dejando siempre un testi-
go microfotográfico. (5,7,21,31,42,55,63,68,74,75)

1. 1967
 2. 1968
 3. 1969
 4. 1970
 5. 1971
 6. 1972
 7. 1973
 8. 1974
 9. 1975
 10. 1976
 11. 1977
 12. 1978
 13. 1979
 14. 1980
 15. 1981
 16. 1982
 17. 1983
 18. 1984
 19. 1985
 20. 1986
 21. 1987
 22. 1988
 23. 1989
 24. 1990
 25. 1991
 26. 1992
 27. 1993
 28. 1994
 29. 1995
 30. 1996
 31. 1997
 32. 1998
 33. 1999
 34. 2000
 35. 2001
 36. 2002
 37. 2003
 38. 2004
 39. 2005
 40. 2006
 41. 2007
 42. 2008
 43. 2009
 44. 2010
 45. 2011
 46. 2012
 47. 2013
 48. 2014
 49. 2015
 50. 2016
 51. 2017
 52. 2018
 53. 2019
 54. 2020
 55. 2021
 56. 2022
 57. 2023
 58. 2024
 59. 2025
 60. 2026
 61. 2027
 62. 2028
 63. 2029
 64. 2030
 65. 2031
 66. 2032
 67. 2033
 68. 2034
 69. 2035
 70. 2036
 71. 2037
 72. 2038
 73. 2039
 74. 2040
 75. 2041
 76. 2042
 77. 2043
 78. 2044
 79. 2045
 80. 2046
 81. 2047
 82. 2048
 83. 2049
 84. 2050
 85. 2051
 86. 2052
 87. 2053
 88. 2054
 89. 2055
 90. 2056
 91. 2057
 92. 2058
 93. 2059
 94. 2060
 95. 2061
 96. 2062
 97. 2063
 98. 2064
 99. 2065
 100. 2066
 101. 2067
 102. 2068
 103. 2069
 104. 2070
 105. 2071
 106. 2072
 107. 2073
 108. 2074
 109. 2075
 110. 2076
 111. 2077
 112. 2078
 113. 2079
 114. 2080
 115. 2081
 116. 2082
 117. 2083
 118. 2084
 119. 2085
 120. 2086
 121. 2087
 122. 2088
 123. 2089
 124. 2090
 125. 2091
 126. 2092
 127. 2093
 128. 2094
 129. 2095
 130. 2096
 131. 2097
 132. 2098
 133. 2099
 134. 2100
 135. 2101
 136. 2102
 137. 2103
 138. 2104
 139. 2105
 140. 2106
 141. 2107
 142. 2108
 143. 2109
 144. 2110
 145. 2111
 146. 2112
 147. 2113
 148. 2114
 149. 2115
 150. 2116
 151. 2117
 152. 2118
 153. 2119
 154. 2120
 155. 2121
 156. 2122
 157. 2123
 158. 2124
 159. 2125
 160. 2126
 161. 2127
 162. 2128
 163. 2129
 164. 2130
 165. 2131
 166. 2132
 167. 2133
 168. 2134
 169. 2135
 170. 2136
 171. 2137
 172. 2138
 173. 2139
 174. 2140
 175. 2141
 176. 2142
 177. 2143
 178. 2144
 179. 2145
 180. 2146
 181. 2147
 182. 2148
 183. 2149
 184. 2150
 185. 2151
 186. 2152
 187. 2153
 188. 2154
 189. 2155
 190. 2156
 191. 2157
 192. 2158
 193. 2159
 194. 2160
 195. 2161
 196. 2162
 197. 2163
 198. 2164
 199. 2165
 200. 2166
 201. 2167
 202. 2168
 203. 2169
 204. 2170
 205. 2171
 206. 2172
 207. 2173
 208. 2174
 209. 2175
 210. 2176
 211. 2177
 212. 2178
 213. 2179
 214. 2180
 215. 2181
 216. 2182
 217. 2183
 218. 2184
 219. 2185
 220. 2186
 221. 2187
 222. 2188
 223. 2189
 224. 2190
 225. 2191
 226. 2192
 227. 2193
 228. 2194
 229. 2195
 230. 2196
 231. 2197
 232. 2198
 233. 2199
 234. 2200
 235. 2201
 236. 2202
 237. 2203
 238. 2204
 239. 2205
 240. 2206
 241. 2207
 242. 2208
 243. 2209
 244. 2210
 245. 2211
 246. 2212
 247. 2213
 248. 2214
 249. 2215
 250. 2216
 251. 2217
 252. 2218
 253. 2219
 254. 2220
 255. 2221
 256. 2222
 257. 2223
 258. 2224
 259. 2225
 260. 2226
 261. 2227
 262. 2228
 263. 2229
 264. 2230
 265. 2231
 266. 2232
 267. 2233
 268. 2234
 269. 2235
 270. 2236
 271. 2237
 272. 2238
 273. 2239
 274. 2240
 275. 2241
 276. 2242
 277. 2243
 278. 2244
 279. 2245
 280. 2246
 281. 2247
 282. 2248
 283. 2249
 284. 2250
 285. 2251
 286. 2252
 287. 2253
 288. 2254
 289. 2255
 290. 2256
 291. 2257
 292. 2258
 293. 2259
 294. 2260
 295. 2261
 296. 2262
 297. 2263
 298. 2264
 299. 2265
 300. 2266
 301. 2267
 302. 2268
 303. 2269
 304. 2270
 305. 2271
 306. 2272
 307. 2273
 308. 2274
 309. 2275
 310. 2276
 311. 2277
 312. 2278
 313. 2279
 314. 2280
 315. 2281
 316. 2282
 317. 2283
 318. 2284
 319. 2285
 320. 2286
 321. 2287
 322. 2288
 323. 2289
 324. 2290
 325. 2291
 326. 2292
 327. 2293
 328. 2294
 329. 2295
 330. 2296
 331. 2297
 332. 2298
 333. 2299
 334. 2300
 335. 2301
 336. 2302
 337. 2303
 338. 2304
 339. 2305
 340. 2306
 341. 2307
 342. 2308
 343. 2309
 344. 2310
 345. 2311
 346. 2312
 347. 2313
 348. 2314
 349. 2315
 350. 2316
 351. 2317
 352. 2318
 353. 2319
 354. 2320
 355. 2321
 356. 2322
 357. 2323
 358. 2324
 359. 2325
 360. 2326
 361. 2327
 362. 2328
 363. 2329
 364. 2330
 365. 2331
 366. 2332
 367. 2333
 368. 2334
 369. 2335
 370. 2336
 371. 2337
 372. 2338
 373. 2339
 374. 2340
 375. 2341
 376. 2342
 377. 2343
 378. 2344
 379. 2345
 380. 2346
 381. 2347
 382. 2348
 383. 2349
 384. 2350
 385. 2351
 386. 2352
 387. 2353
 388. 2354
 389. 2355
 390. 2356
 391. 2357
 392. 2358
 393. 2359
 394. 2360
 395. 2361
 396. 2362
 397. 2363
 398. 2364
 399. 2365
 400. 2366
 401. 2367
 402. 2368
 403. 2369
 404. 2370
 405. 2371
 406. 2372
 407. 2373
 408. 2374
 409. 2375
 410. 2376
 411. 2377
 412. 2378
 413. 2379
 414. 2380
 415. 2381
 416. 2382
 417. 2383
 418. 2384
 419. 2385
 420. 2386
 421. 2387
 422. 2388
 423. 2389
 424. 2390
 425. 2391
 426. 2392
 427. 2393
 428. 2394
 429. 2395
 430. 2396
 431. 2397
 432. 2398
 433. 2399
 434. 2400
 435. 2401
 436. 2402
 437. 2403
 438. 2404
 439. 2405
 440. 2406
 441. 2407
 442. 2408
 443. 2409
 444. 2410
 445. 2411
 446. 2412
 447. 2413
 448. 2414
 449. 2415
 450. 2416
 451. 2417
 452. 2418
 453. 2419
 454. 2420
 455. 2421
 456. 2422
 457. 2423
 458. 2424
 459. 2425
 460. 2426
 461. 2427
 462. 2428
 463. 2429
 464. 2430
 465. 2431
 466. 2432
 467. 2433
 468. 2434
 469. 2435
 470. 2436
 471. 2437
 472. 2438
 473. 2439
 474. 2440
 475. 2441
 476. 2442
 477. 2443
 478. 2444
 479. 2445
 480. 2446
 481. 2447
 482. 2448
 483. 2449
 484. 2450
 485. 2451
 486. 2452
 487. 2453
 488. 2454
 489. 2455
 490. 2456
 491. 2457
 492. 2458
 493. 2459
 494. 2460
 495. 2461
 496. 2462
 497. 2463
 498. 2464
 499. 2465
 500. 2466
 501. 2467
 502. 2468
 503. 2469
 504. 2470
 505. 2471
 506. 2472
 507. 2473
 508. 2474
 509. 2475
 510. 2476
 511. 2477
 512. 2478
 513. 2479
 514. 2480
 515. 2481
 516. 2482
 517. 2483
 518. 2484
 519. 2485
 520. 2486
 521. 2487
 522. 2488
 523. 2489
 524. 2490
 525. 2491
 526. 2492
 527. 2493
 528. 2494
 529. 2495
 530. 2496
 531. 2497
 532. 2498
 533. 2499
 534. 2500
 535. 2501
 536. 2502
 537. 2503
 538. 2504
 539. 2505
 540. 2506
 541. 2507
 542. 2508
 543. 2509
 544. 2510
 545. 2511
 546. 2512
 547. 2513
 548. 2514
 549. 2515
 550. 2516
 551. 2517
 552. 2518
 553. 2519
 554. 2520
 555. 2521
 556. 2522
 557. 2523
 558. 2524
 559. 2525
 560. 2526
 561. 2527
 562. 2528
 563. 2529
 564. 2530
 565. 2531
 566. 2532
 567. 2533
 568. 2534
 569. 2535
 570. 2536
 571. 2537
 572. 2538
 573. 2539
 574. 2540
 575. 2541
 576. 2542
 577. 2543
 578. 2544
 579. 2545
 580. 2546
 581. 2547
 582. 2548
 583. 2549
 584. 2550
 585. 2551
 586. 2552
 587. 2553
 588. 2554
 589. 2555
 590. 2556
 591. 2557
 592. 2558
 593. 2559
 594. 2560
 595. 2561
 596. 2562
 597. 2563
 598. 2564
 599. 2565
 600. 2566
 601. 2567
 602. 2568
 603. 2569
 604. 2570
 605. 2571
 606. 2572
 607. 2573
 608. 2574
 609. 2575
 610. 2576
 611. 2577
 612. 2578
 613. 2579
 614. 2580
 615. 2581
 616. 2582
 617. 2583
 618. 2584
 619. 2585
 620. 2586
 621. 2587
 622. 2588
 623. 2589
 624. 2590
 625. 2591
 626. 2592
 627. 2593
 628. 2594
 629. 2595
 630. 2596
 631. 2597
 632. 2598
 633. 2599
 634. 2600
 635. 2601
 636. 2602
 637. 2603
 638. 2604
 639. 2605
 640. 2606
 641. 2607
 642. 2608
 643. 2609
 644. 2610
 645. 2611
 646. 2612
 647. 2613
 648. 2614
 649. 2615
 650. 2616
 651. 2617
 652. 2618
 653. 2619
 654. 2620
 655. 2621
 656. 2622
 657. 2623
 658. 2624
 659. 2625
 660. 2626
 661. 2627
 662. 2628
 663. 2629
 664. 2630
 665. 2631
 666. 2632
 667. 2633
 668. 2634
 669. 2635
 670. 2636
 671. 2637
 672. 2638
 673. 2639
 674. 2640
 675. 2641
 676. 2642
 677. 2643
 678. 2644
 679. 2645
 680. 2646
 681. 2647
 682. 2648
 683. 2649
 684. 2650
 685. 2651
 686. 2652
 687. 2653
 688. 2654
 689. 2655
 690. 2656
 691. 2657
 692. 2658
 693. 2659
 694. 2660
 695. 2661
 696. 2662
 697. 2663
 698. 2664
 699. 2665
 700. 2666
 701. 2667
 702. 2668
 703. 2669
 704. 2670
 705. 2671
 706. 2672
 707. 2673
 708. 2674
 709. 2675
 710. 2676
 711. 2677
 712. 2678
 713. 2679
 714. 2680
 715. 2681
 716. 2682
 717. 2683
 718. 2684
 719. 2685
 720. 2686
 721. 2687
 722. 2688
 723. 2689
 724. 2690
 725. 2691
 726. 2692
 727. 2693
 728. 2694
 729. 2695
 730. 2696
 731. 2697
 732. 2698
 733. 2699
 734. 2700
 735. 2701
 736. 2702
 737. 2703
 738. 2704
 739. 2705
 740. 2706
 741. 2707
 742. 2708
 743. 2709
 744. 2710
 745. 2711
 746. 2712
 747. 2713
 748. 2714
 749. 2715
 750. 2716
 751. 2717
 752. 2718
 753. 2719
 754. 2720
 755. 2721
 756. 2722
 757. 2723
 758. 2724
 759. 2725
 760. 2726
 761. 2727
 762. 2728
 763. 2729
 764. 2730
 765. 2731
 766. 2732
 767. 2733
 768. 2734
 769. 2735
 770. 2736
 771. 2737
 772. 2738
 773. 2739
 774. 2740
 775. 2741
 776. 2742
 777. 2743
 778. 2744
 779. 2745
 780. 2746
 781. 2747
 782. 2748
 783. 2749
 784. 2750
 785. 2751
 786. 2752
 787. 2753
 788. 2754
 789. 2755
 790. 2756
 791. 2757
 792. 2758
 793. 2759
 794. 2760
 795. 2761
 796. 2762
 797. 2763
 798. 2764
 799. 2765
 800. 2766
 801. 2767
 802. 2768
 803. 2769
 804. 2770
 805. 2771
 806. 2772
 807. 2773
 808. 2774
 809. 2775
 810. 2776
 811. 2777
 812. 2778
 813. 2779
 814. 2780
 815. 2781
 816. 2782
 817. 2783
 818. 2784
 819. 2785
 820. 2786
 821. 2787
 822. 2788
 823. 2789
 824. 2790
 825. 2791
 826. 2792
 827. 2793
 828. 2794
 829. 2795
 830. 2796
 831. 2797
 832. 2798
 833. 2799
 834. 2800
 835. 2801
 836. 2802
 837. 2803
 838. 2804
 839. 2805
 840. 2806
 841. 2807
 842. 2808
 843. 2809
 844. 2810
 845. 2811
 846. 2812
 847. 2813
 848. 2814
 849. 2815
 850. 2816
 851. 2817
 852. 2818
 853. 2819
 854. 2820
 855. 2821
 856. 2822
 857. 2823
 858. 2824
 859. 2825
 860. 2826
 861. 2827
 862. 2828
 863. 2829
 864. 2830
 865. 2831
 866. 2832
 867. 2833
 868. 2834
 869. 2835
 870. 2836
 871. 2837
 872. 2838
 873. 2839
 874. 2840
 875. 2841
 876. 2842
 877. 2843
 878. 2844
 879. 2845
 880. 2846
 881. 2847
 882

E) PROCESADO DE LA BIOPSIA RENAL A ESTUDIAR POR INMUNOFLOU- RESCENCIA.

1) Obtención y transporte de la pieza. La pieza para procesar deberá tener unas dimensiones mínimas de 0.5x0.5 cm. y dado que se precisarán además otros tantos fragmentos para el estudio con microscopía óptica clásica y para el microscopio electrónico nosotros recomendamos efectuar las biopsias quirúrgicamente por lumbotomía y con anestesia general.

El transporte de la pieza desde el quirófano hasta el laboratorio lo efectuamos depositando la pieza entre gases empapadas con suero fisiológico frío todo lo cual está rodeado de bolsas de hielo perfectamente cerradas y dentro de una caja de material impermeable y aislante. El tiempo que transcurra entre la obtención de la pieza, el transporte y la siguiente congelación, debe ser el menor posible, 5-10 minutos, sin embargo diversos autores conceden un margen de una hora antes de que la autólisis enmascare la técnica. La obtención de la pieza de cadáver puede efectuarse durante unas horas después del fallecimiento.

2) Congelación rápida. La pieza así obtenida y sin pérdida de tiempo se coloca sobre un cubo de corcho de 1x1 cm. o sobre un rectángulo de papel secante, encima de la pieza se depositan 1 ó 2 gotas de un aglutinante tamponado (Embedding Matrix) y a continuación o bien se envuelve con papel de plata previamente rotulado (en el caso de almacenamiento de gran número de piezas) o bien se deposita en la propia platina del criostato previas gotas de aglutinante para fijar el conjunto. A continuación ya sea el paquetito de papel de plata o el conjunto pieza-platina se introducen en un frasco Dewar con nitrógeno líquido, dejando congelar (-170°) durante unos dos minutos (según el grosor de la pieza). A continuación puede pasarse al corte en el criostato (-20°) o bien almacenarse en el mismo criostato durante 10-12 días. En caso de disponer de refrigerador a -70° la pieza puede conser-

vase varios meses.

Como frasco Dewar nosotros utilizamos un termo de uso domestico de boca ancha que llenamos en sus $3/4$ partes con nitrógeno líquido. En caso de efectuar la congelación utilizando el conjunto pieza-platina nos servimos de una rejilla en forma de cucharón al que se acomoda la platina. La introducción de este cucharón en el nitrógeno líquido debe ser paulatina pues de lo contrario la ebullición del nitrógeno líquido podría hacer saltar la pieza.

Despues de la congelación no debe tocarse la pieza con los dedos pues su calor podría descongelar la pieza. La descongelación de la pieza da lugar a la pérdida definitiva de sus propiedades antigénicas aun cuando vuelva a congelarse posteriormente.

Diversos autores efectuan la congelación de la pieza estando sumergida en un recipiente con isopentano enfriado con el nitrógeno líquido; con ello se evitaría la formación de cristales intracelulares si por algún motivo la pieza alcanzase posteriormente los 0°C . Con este método nosotros hemos tenido dificultades para evitar la congelación simultánea del isopentano; no lo utilizamos.

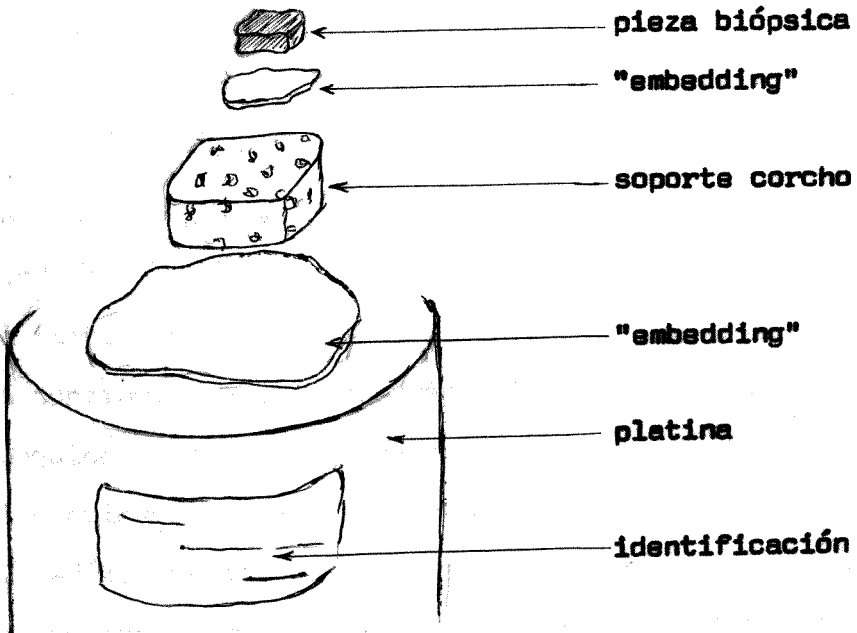
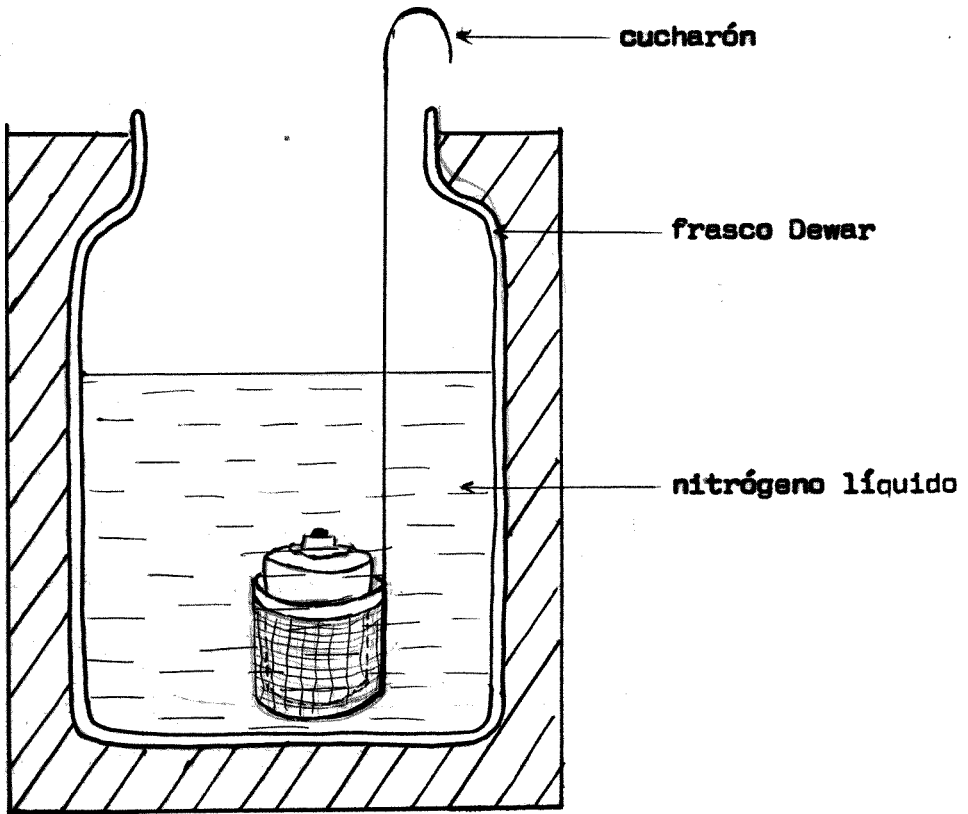
De carecer de nitrógeno líquido es posible efectuar la congelación con una mezcla a partes iguales de nieve carbónica y acetona; la congelación entonces deberá ser más prolongada y efectuada en un recipiente impermeable para que la pieza no entre en contacto con la mezcla congelante.

3) Obtención de los cortes.

Utilizamos un criostato "Slee" consistente en un microtomo de precisión encerrado en una cámara a -20°C .

Previamente y con una pieza inservible se deberá haber regulado la inclinación de la cuchilla respecto a la platina y al cristal antiarrollamiento, así mismo se deberá ajustar la altura de dicho cristal para que coincida exactamente con el filo de la cu-

SISTEMA DE CONGELACIÓN DE LA PIEZA BIÓPSICA



chilla; estas maniobras deben ser efectuadas con toda exactitud pues de lo contrario la pieza se arruga y rompe, cabalga sobre el cristal antiarrolamiento o no se introduce en el hueco existente entre dicho cristal y la cuchilla. La obtención de unos buenos cortes depende de una perfecta puesta a punto de estos parámetros.

Se recomienda introducir uno de los extremos de la cuchilla en un recipiente con una mezcla de nieve carbónica y acetona para que el filo de la cuchilla este más frío que la pieza y obtener así mejores cortes.

A continuación se efectúan los cortes con un grosor de 4-6 micras recogiendo por adherencia a un portaobjetos que esta a la temperatura ambiente. Los portas con los cortes se disponen en una gradilla al aire libre, se tomarán tantos portas como inmunosueros a ensayar más los controles precisos. Es recomendable la observación de estos cortes con el microscopio de luz ordinaria (en contraste de fases o con el condensador muy descendido) para asegurar su validez antes de pasar al inmunomarcado.

4) Técnica del inmunomarcado. Se circunscriben los cortes con un círculo efectuado en el porta con una punta de diamante para así poder precisar la localización y el lado en que se encuentran los cortes, ya que mojados y sin tinción visible son de difícil localización.

A continuación se colocan los portas en las gradillas correspondientes y se pasan por tres baños sucesivos de solución salina tamponada a pH 7'2-7'3 durante cinco minutos cada uno.

A continuación un pase "rápido" por agua destilada.

Seguidamente baño en acetona a 4°C durante 30 segundos.

A continuación nuevo lavado con solución salina tamponada a pH 7'2-7'3; se secan luego con un trapo o papel secante cada uno de los portas rotulándose para identificar los inmunosueros contra el que se enfrenta cada pieza de cada porta.

AJUSTAJE DEL MICROTOMO