Contribución de la inmunofluorescencia al estudio de las nefropatías glomerulares

Alberto Torras Rabasa

CONTRIBUCION DE LA INMUNOFLUORESCENCIA AL ESTUDIO DE LAS NEFROPATIAS GLOMERULARES

por Alberto TORRAS RABASA

PARTE PRACTICA

LAS TECNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA 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 ademas su localización gracias al marcado previo del anticuerpo con una sustancia fluorescente, que ademas 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 fluoresceina.

Hasta 1955 la inmunofluorescencia había sido un privilegio de ciertos laboratorios bien equipados, capaces de realizar la sintesis del isocianato de fluoresceina, para lo que se precisaba la hidrogenación catalítica y sobre todo el empleo del fosfógeno tóxico; era preciso disponer tambien del conjunto de una fuente de luz rica en radiaciones ultravioletas (U.V.) y los instrumentos opticos 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 antisueros marcados de laboratorios dignos de confianza hace posible la utilización de la inmunofluorescencia co-

mo tecnica de rutina.

La inmunofluorescencia a la vez que permite reconocer una reacción antigeno-anticuerpo establece la topografia 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 antigenos asi 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 autoantigeno gastrico que reacciona con los anticuerpos de un paciente con anemia perniciosa. Aislamos IgG del suero del paciente, lo conjugamos con fluoresceina y lo aplicamos a un corte de mucosa gastrica humana; observando esta preparación con el microscopio U.V. podemos ver el citoplasma de las células parietales fluorescente.

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

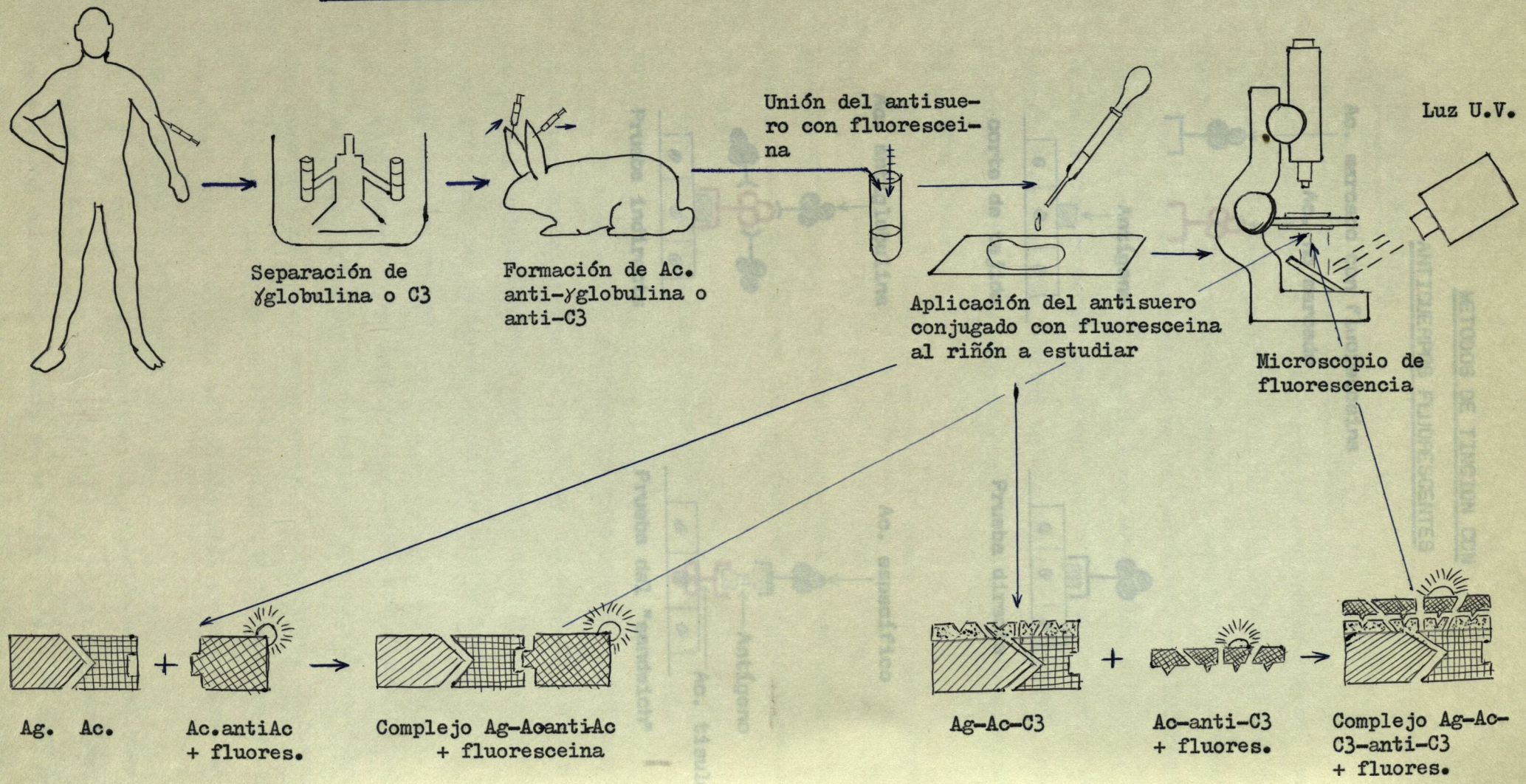
b) Prueba indirecta. El anticuerpo no marcado se aplica directamente al sustrato de tejido y se hace visible tratandolo con un suero antiglobulina inmune conjugado con fluorocromo. Siguiendo el ejemplo anterior podemos aplicar la prueba indirecta para saber si el paciente tiene anticuerpos contra las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

tales gastricas. Primero se enfrenta el corte de estomago con el suero del paciente, despues de lavar bien se aplica suero antiglobulina humana de conejo marcado con fluoresceina; si el suero del paciente contenia anticuerpos contra las células parietales gastricas, dichos anticuerpos se habrán fijado en el estomago y a ellos se fijará la antiglobulina marcada que los revelara.

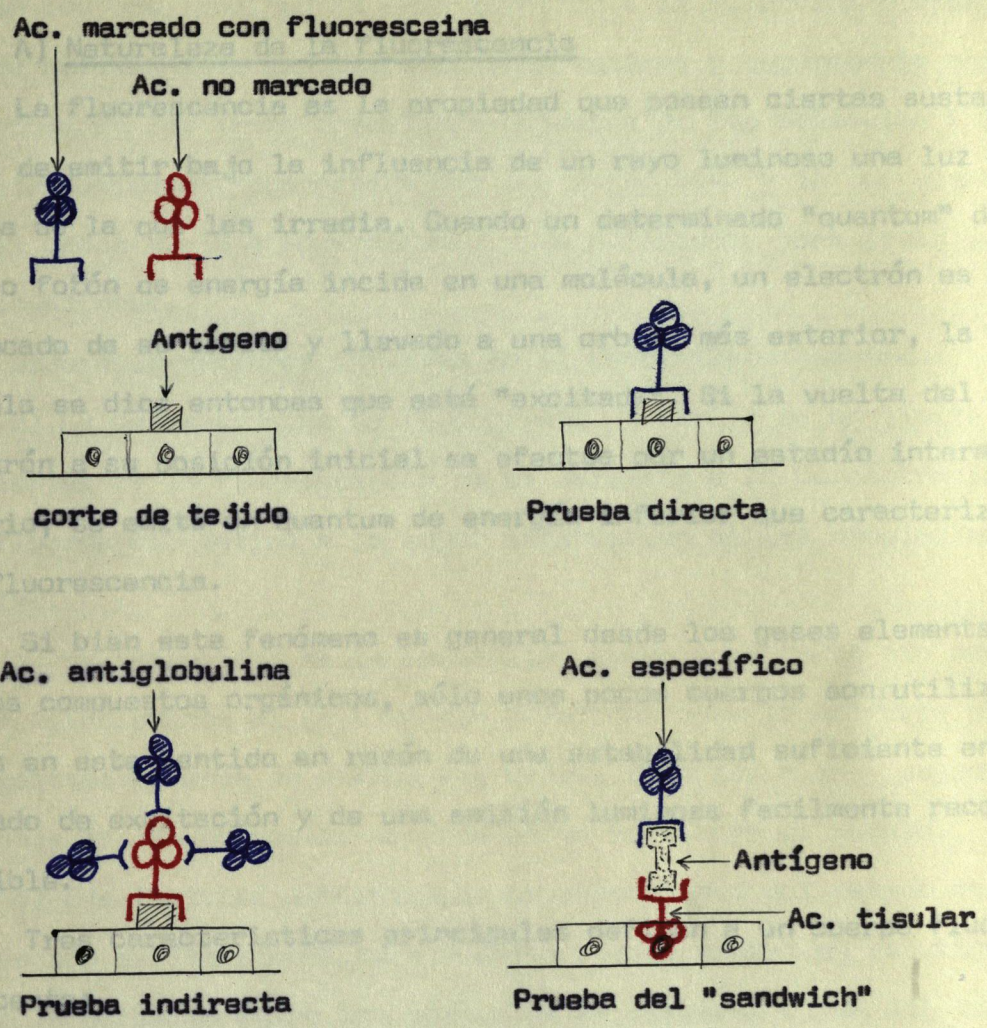
c) Prueba del "Sandwich"

Este es un procedimiento de doble capa, diseñado para visualizar anticuerpos especificos. Si por ejemplo quisieramos ver cuantas células de una preparación de tejido linfoide estaban sintetizando anticuerpos contra el polisacarido 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 antigeno polisacarido. Despues de lavar se aplica anticuerpo polisacarido marcado con fluoresceina para localizar las células que habian fijado especificamente el antigeno y con ello se infiere la sintesis de dicho anticuerpo en esta célula.

PRINCIPIOS Y TECNICA DE LA INMUNOFLUORESCENCIA



METODOS DE TINCION CON ANTICUERPOS FLUORESCENTES



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 estadío intermediario, 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 facilmente reconocible.

Tres caracteristicas 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 esta 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.

Asi 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 esta 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 lampara puede encenderse inmediatamente despues de apagarse, de no ser asi la lámpara no puede volver a encenderse hasta transcurridos por lo menos 15 minutos, de lo contrario los elctrodos pueden alterarse al estar el mercurio parcialmente vaporizado.

Otros arcos: El de xenon o el de xenon-mercurio funcionan a presiones elevadas tanto encendidas como apagadas siendo por tanto constante el peligro de explosión. El espectro de emisión es mas 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 fluoresceina; 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. tambien 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 esta de la fuente de luz y es el que proteje a los demás filtros de calentamientos excesivos.

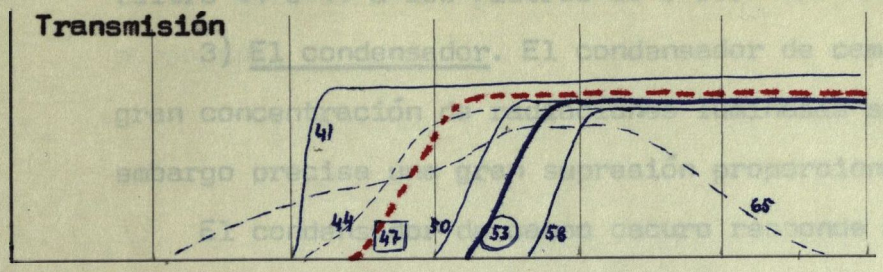
- El filtro de excitación es que no deja pasar mas que las radiaciones de excitación, o sea los U.V., si se utiliza fluorescencia en U.V. o el violeta y el azul si se utiliza la fluorescencia azul-violeta.

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. Asi 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.

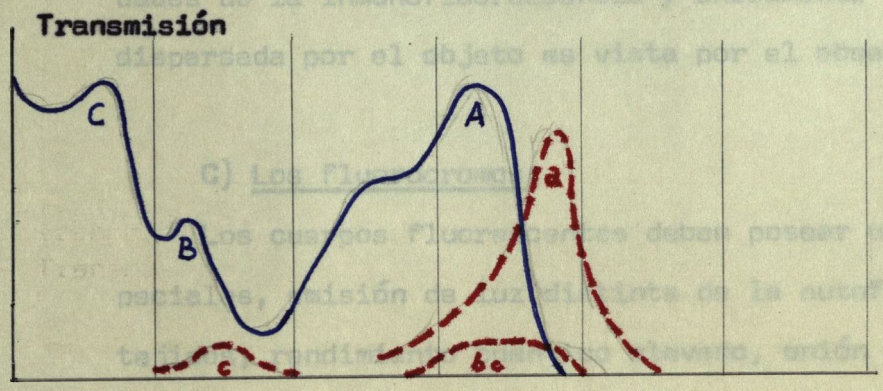
Los filtros supresores 41-44-47, más claros, estan libres de la molesta fluorescencia propia, en tanto que los 50 y 53 más oscuros pueden fluorescer sensiblemente al ser iluminados directamente con luz de excitación. Este fenómeno se reconoce por un velo rojo que se extiende por toda la imajen (no confundirlo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

CURVAS DE EMISION Y TRANSMISION DE LA LAMPARA

FILTROS Y FLUORESCEINA



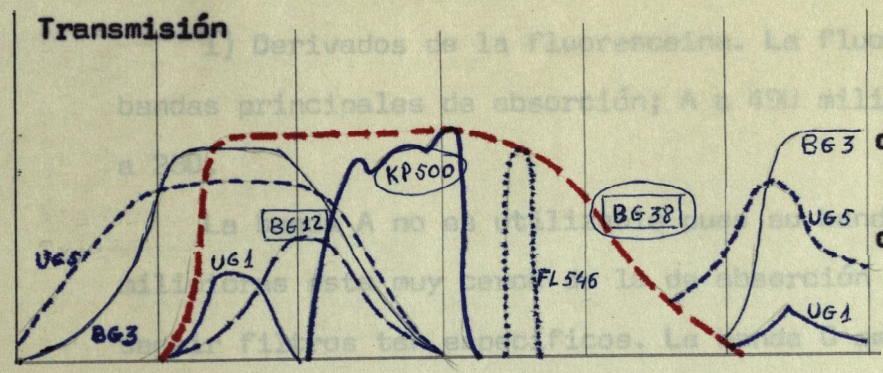
Filtros supresores



Fluoresceina

absorción

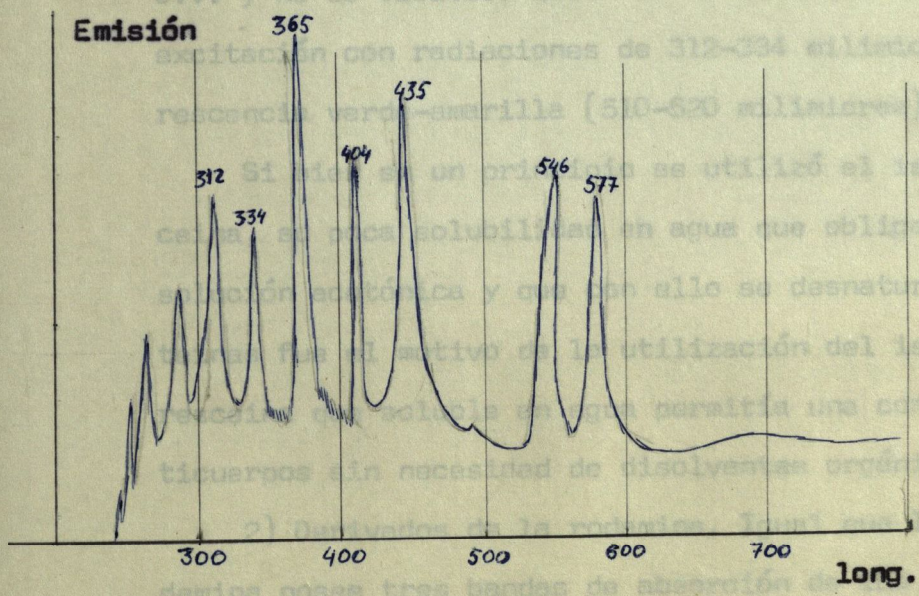
emisión



Filtros excitadores

condensador campo claro

condensador campo oscuro



Lámpara vapor de mercurio, HB 200W/4

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.

C) 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 proteina o anticuerpo, etc..

1) Derivados de la fluoresceina. La fluoresceina 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 fluoresceina, su poca solubilidad en agua que obligaba a disolverla en solución acetónica y que con ello se desnaturalizaba algo las proteinas fue el motivo de la utilización del isotiocianato de fluoresceina que soluble en agua permitía una conjugación con los anticuerpos sin necesidad de disolventes orgánicos.

2) Derivados de la rodamina. Igual que la fluoresceina 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 emisión de 595 milimicras (amarillo) y otra de 710 milimicras (rojo lejano) que en conjunto da un aspecto anaranjado.

NUESTRA EXPERIENCIA

Nuestras combinaciones de filtros Zeiss utilizando antisueros marcados con fluoresceina 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 fluoresceina; el filtro de supresión 530 con una curva de transmisión tambien muy bien delimitada permite el paso único de la banda a de emisión de la fluoresceina 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 higado 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 fluoresceina 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, tambien 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 fluoresceina. Sin embargo la distinción de colores con escasa iluminación es dificil ya que la visión escotópica es incolora. Por ello es interesante un exámen previo de la preparación sin teñir.

Limites del poder de resolución microscópico en inmunofluorescencia.

La observación de estucturas 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, loa rayosemitidos 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 tambien 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 contínua con rayos U.V. (minutos), por ello las preparaciones deben ser teñidas

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

E) PROCESADO DE LA BIOPSIA RENAL A ESTUDIAR POR INMUNOFLUORESCENCIA.

1) Obtención y transporte de la pieza. La pieza para procesar deberá tener unas dimensiones mínimas de 05x05 cm. y dado que se precisarán ademas ademas otros tantos fragmentos para el estudio con microscopía óptica clásica y para el microscopio electrónico nosotros recomendamos efectuar las biopsias quirurgicamente por lumbotomía y con anestesia general.

El transporte de la pieza desde èl quirófano hasta el laboratorio lo efectuamos depositando la pieza entre gasas empapadas con suero fisiológico frío todo lo cual esta 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 autolisis enmascare la técnica. La obtención de la pieza de cadaver puede efectuarse durante unas horas despues del fallecimiento.

2) Congelación rápida. La pieza asi obtenida y sin perdida de tiempo se coloca sobre un cubo de corcho de 1x1 cm. o sobre un rectangulo 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 (-170º) durante unos dos minutos (según el grosor de la pieza). A continuación puede pasarse al corte en el criostato (-20º) o bien almacenarse en el mismo criostato durante 10-12 dias. En caso de disponer de refrigerador a -70º la pieza puede conser-

varse 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 ulteriormente los 0ºC. Con este método nosotros hemos tenido dificultades para evitar la congelación simultánea del isopentano; no lo utilizamos.

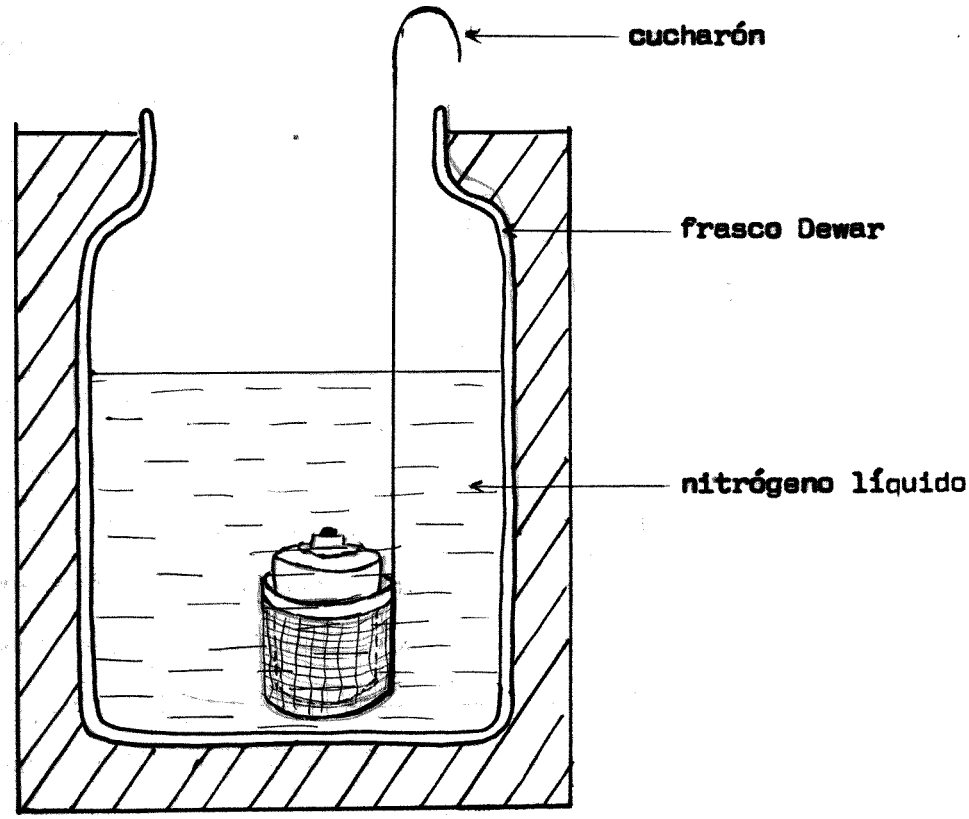
De carecer de nitrógeno líquido es posible efectuar la congelación con una mezcla a partes iguales de nieve carbónica y acetona; la congelación entonces deberá ser más prolongada y efectuada en un recipiente impermeable para que la pieza no entre en en contacto con la mezcla congelante.

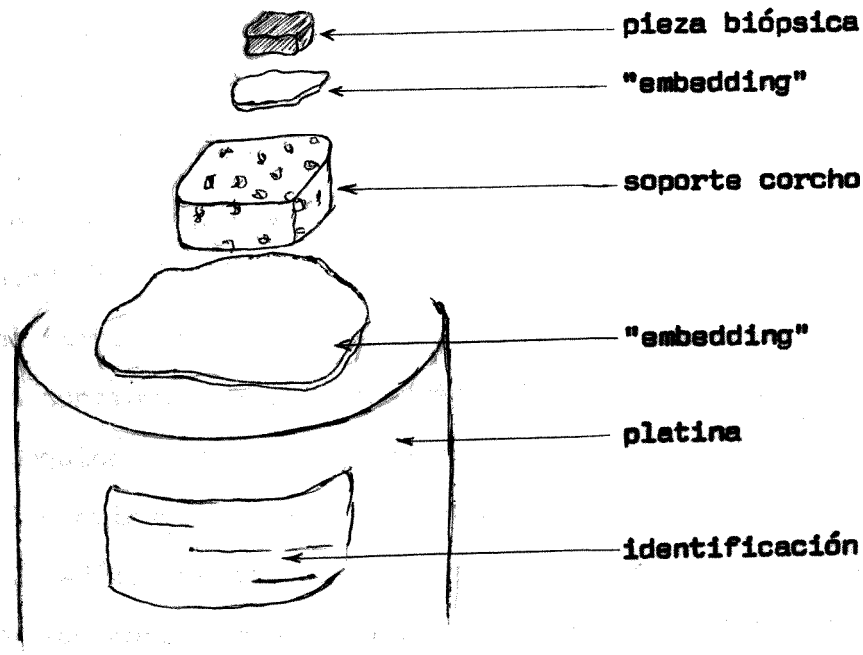
3) <u>Obtención de los cortes.</u>

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

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 BIOPSICA





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 apunto 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 recogiéndose 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 circulo 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 dificil localización.

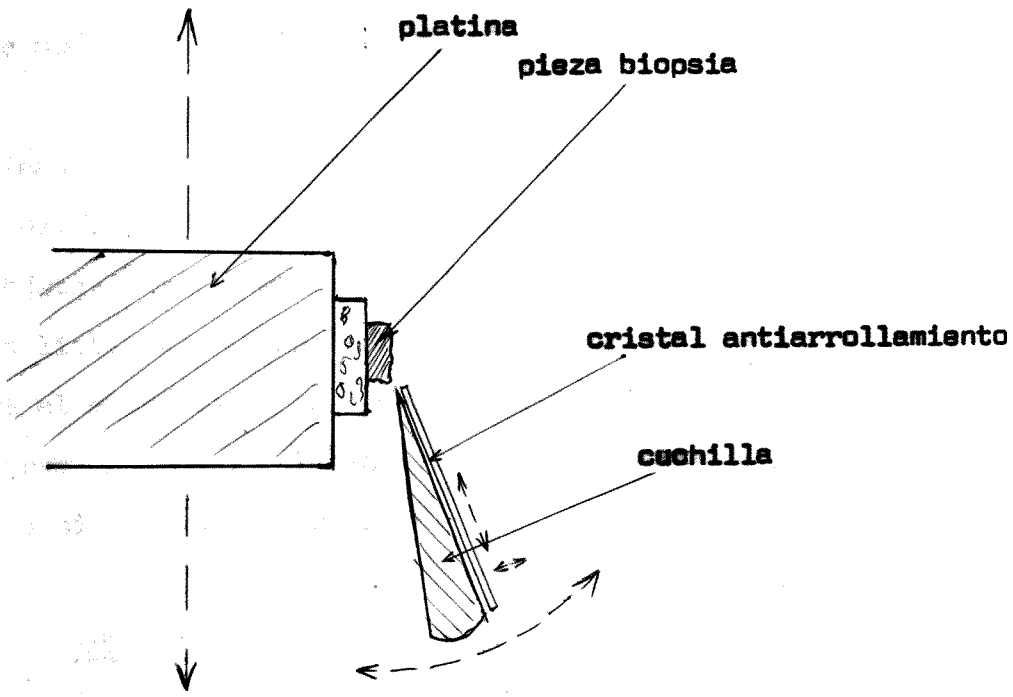
A continuación se colocan los portas en las gradillas correspondientes y se pasan por tres baños sucesivos de solución salina tamponada a pH 7'2-7'3 durante cinco minutos cada uno.

A continuación un pase "rápido" por agua destilada.

Seguidamente baño en acetona a 4ºC 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



<— — — —> desplazamientos posibles

Con pipetas de uso único se cubre cada corte con el antisuero específico marcado con fluoresceina. Sin dejar secar el inmunosuero (para lo cual se colocan en un ambiente húmedo, p.ej. en una campana de cristal con un recipiente con agua destilada)se colocan en lugar oscuro durante 30 minutos al cabo de los cuales se seca el inmunosuero sobrante con un papel secante.

A continuación se efectúan tres nuevos lavados sucesivos de cinco minutos de duración cada uno en la ya dicha solución tamponada. Limpiar el exceso de líquido con un trapo y montar el cubre objetos con glicerina tamponada. Efectuado esto la preparación esta lista para la lectura según el procedimiento ya detallado para el microscopio de fluorescencia. No debe tardarse más de 3 ó 4 horas en efectuar la lectura, es posible demorar su lectura 24 horas si se conserva a -20ºC.

APENDICE:

Como aglomerante para pegar la pieza al soporte y esta a la platina utilizamos el Embedding Matrix de la casa Lipshaw.

Como glicerina tamponada para montar el cubreobjetos utilizamos el Fa Mounting Fluid de la casa Difco.

Para efectuar la solución salina tamponada utilizamos el Hemaglutination Buffer de pH 7´2 disuelto en un litro de agua destilada.

Los antisueros utilizados son de la casa Hyland:

-anti IgA
-anti IgG
-anti IgM marcados con fluoresceina
-anti C3
-anti fibrinógeno

Una vez disuelto el polvo antisuero con el disolvente debe guardarse a 4ºC siendo utilizables indefinidamente.