

Protocolos generales para cortes histológicos de ovarios de peces.

Este fichero incluye:

Preparación de formol

Protocolo procesador de tejidos

Protocolo de tinción H-E general

Protocolos de tinción específicos

Preparación de formol tamponado para gónadas:

- 3.6 % formaldehido:

1 litro formol (35/40)

9 litros agua

- 46.0 g Sodio dihidrogenofosfato
- 81.9 g Di-sodio hidrogeno fosfato

Procesador de tejidos

Etapa	Solución	Programa				Tipo
		P1	P2	P3	P4	
1	Etanol 70 %	1 h	5'	30'	45'	1 h
2	Primer Etanol 96 %	2 h	1 h 30'	1 h	1 h 30'	2 h
3	Segundo Etanol 96 %	2 h	1 h 30'	1 h	1 h 30'	2 h
4	Primer Etanol 100 %	2 h	1 h 30'	1 h	1 h 30'	2 h
5	Segundo Etanol 100 %	2 h	1 h 30'	1 h	1 h 30'	2 h
6	Etanol-Benceno al 50 %	3 h	2 h 15'	1 h 30'	2 h 15'	3 h
7	Primer Benceno	2 h	1 h 30'	1 h	1 h 30'	2 h
8	Segundo Benceno	2 h	1 h 30'	1 h	1 h 30'	2 h
9	Benceno-Parafina al 50 %	3 h	2 h 15'	1 h 30'	2 h 15'	3 h
10	Primera Parafina	4 h	3 h	2 h	3 h	2 h
11	Segunda Parafina					2 h
Total		23 h	16 h 35'	11 h 30'	17 h 15'	23 h

NOTA: El Programa P2 se utiliza cuando se retrasa el comienzo más de 40 minutos. Si el proceso comienza en el momento de poner en marcha el procesador entonces usar el P4

Protocolo de tinción de cortes histológicos de ovarios

Etapa	Solución	Tiempo	Etapa	Solución	Tiempo
1	Primer Xileno	20 min	14	Carbonato de Litio	10 sg.
2	Segundo Xileno	20 min	15	Agua destilada	5 inmersiones
3	Primer Etanol 100 %	5 inmersiones	16	Etanol 70 %	5 inmersiones
4	Segundo Etanol 100 %	1 min	17	Etanol 80 %	1 min
5	Tercer Etanol 100 %	1 min	18	Eosina Floxina b	1,5 min
6	Etanol 96 %	3 min	19	Primer Etanol 96 %	3 inmersiones
7	Etanol 80 %	3 min	20	Segundo Etanol 96 %	1 min
8	Etanol 70 %	3 min	21	Tercer Etanol 96 %	1 min
9	Primera Agua destilada	5 min	22	Primer Etanol 100 %	3 inmersiones
10	Segunda Agua destilada	5 min	23	Segundo Etanol 100 %	1 min
11	Hematoxilina de Harris	4 min	24	Primer Xileno	5 inmersiones
12	Alcohol ácido	4 inmersiones	25	Segundo Xileno	5 min
13	Agua corriendo	10 min	26	Tercer Xileno	3 min

Hematoxilina-Eosina

Soluciones

Hematoxilina de Harris (Papanicolau)

Alcohol Ácido:

5ml HCL concentrado en 1000 ml EtOH 70%

Carbonato de Litio:

Disolver Carbonato de Litio en agua destilada hasta saturar

Eosina-Floxina:

Solución almacén de Eosina:

10 g de Eosina Amarillenta

1000 ml de agua destilada

Solución almacén de Floxina B:

1 g de Floxina B

100 ml de agua destilada

Solución de trabajo:

100 ml de Eosina almacén

10 ml de Floxina B almacén

780 ml de EtOH 95 %

5 ml ácido acético gacial

Método

- 1- Desparafinar, hidratar
- 2- Teñir con Hematoxilina
- 3- Lavar y diferenciar con alcohol ácido y Carbonato de Litio
- 4- Deshidratar con alcohol hasta 80%
- 5- Tratar los cortes con Eosina-floxina
- 6- Lavar
- 7- Deshidratar
- 8- Montar

Protocolo Autoteñidor (programa 2)

Paso	Estación	Reagente	Tiempo (min:seg)	Exacto
1	16	Xileno	10:00	N
2	1	Etanol 100 %	4:00	N
3	4	Etanol 80 %	3:00	N
4	W4	Agua	2:00	N
5	7	Papanicolau (Hemato. Harris)	4:00	S
6	W1	Agua	2:00	N
7	15 (cub 15)	Alcohol ácido	0:10	S
8	W2	Agua	3:00	N
9	14 (cub 14)	Carbonato de Litio	0:10	S
10	W3	Agua	1:00	N
11	5	Etanol 70 %	1:00	N
12	6	Eosina Floxina b	2:00	S
13	3	Etanol 96 %	2:00	N
14	2	Etanol 100 %	2:00	N
15	17	Xileno	5:00	N
16	18	Xileno	3:00	N
EXIT		XILENO		

HEMATOXILINA-VOF

Soluciones

Hematoxilina de Harris

Colorante VOF

Se mezclan en un mortero

0.8 g de Verde luz SF amarillento

1 g de Orange G

1.2 g de Fucsina ácida

hasta obtener un polvo castaño uniforme. Se añaden 200 ml de agua destilada a unos 90° y agitamos hasta disolver, luego se deja enfriar a la temperatura del laboratorio, añadiendo

3.0 g de Ácido fosfotúngstico

y después de disolverlo se adicionan

8 ml de Ácido acético glacial y

400 ml de Etanol absoluto.

El colorante así preparado se puede conservar por tiempo indefinido en un frasco de color topacio.

Método

1. Se desparafinan los cortes
2. se llevan a agua destilada.
3. Hematoxilina 3-5 min.
4. Se viran con agua corriente,
5. Se lavan con agua destilada y después de bien escurridos
6. Colorante VOF 3-4 min.
7. se lavan ligeramente
8. se pasan a etanol absoluto renovándolo tres veces y seguidamente se llevan a xilol donde después de dos cambios se montan.

Protocolo Autoteñidor (programa 5)

Paso	Estación	Reagente	Tiempo (min:seg)	Exacto
1	16	XILENO	10:00	NO
2	1	ETANOL 100%	4:00	NO
3	4	ETANOL 80%	3:00	NO
4	W1	AGUA	2:00	NO
5	11	HEMATOXILINA HARRIS	4:00	SI
6	W2	AGUA	3:00	NO
7	15 (cub 15)	ALCOHOL ÁCIDO	0:10	NO
8	W3	AGUA	3:00	NO
9	9	VOF	3:30	SI
10	W4	AGUA	1:00	NO
11	5	ETANOL 70%	1:00	NO
12	3	ETANOL 96%	2:00	NO
13	2	ETANOL 100%	2:00	NO
14	17	XILENO	5:00	NO
15	18	XILENO	3:00	NO
EXIT		XILENO		

CARMIN DE BEST

Soluciones

a. Carmín para guardar

Añadir a 120 ml de agua destilada hirviendo:

4 g de Carmín

2 g de Carbonato de Potasio

10 g de Cloruro de Potasio

Hervir durante 5 minutos (usar frasco grande para evitar salpicaduras)

Enfriar y añadir 40 ml de amoníaco concentrado

Filtrar y guardar en un recipiente oscuro a 4°C, donde se conserva varios meses.

b. Solución de Carmín para trabajar

Solución para guardar.....160 ml

Amoníaco concentrado.....160 ml

Metanol.....160 ml

c. Diferenciador de Best

Metanol.....120 ml

Etanol.....240 ml

Agua destilada.....300 ml

d. Hematoxilina (de Harris).

Consejos

Filtrar la solución de Carmín para evitar que precipite en la preparación.

Método

- 1.Desparafinar e hidratar
- 2.Colorear el núcleo con la hematoxilina, y diferenciar en alcohol ácido para que el fondo esté claro.
- 3.Lavar en agua corriente
- 4.Teñir con Carmín de 5 a 15 minutos (+tiempo cuanto más vieja esté la solución).
- 5.Lavar bien en el diferenciador
- 6.Deshidratar en alcohol absoluto
- 7.Clarificar en Xileno

Protocolo Autoteñidor (programa 6)

Paso	Estación	Reagente	Tiempo (min:seg)	Exacto
1	16	XILENO	10:00	NO
2	1	ETANOL 100%	4:00	NO
3	4	ETANOL 80%	3:00	NO
4	W3	AGUA	2:00	NO
5	11	HEMATOXILINA HARRIS	4:00	SI
6	W2	AGUA	3:00	NO
7	15 (cub 15)	ALCOHOL ÁCIDO	0:10	SI
8	W1	AGUA	3:00	NO
9	13	CARMÍN	5:00	SI
10	14 (cub 14)	DIFERENCIADOR	10:00	NO
11	5	ETANOL 70%	1:00	NO
12	3	ETANOL 96%	2:00	NO
13	2	ETANOL 100%	2:00	NO
14	17	XILENO	5:00	NO
15	18	XILENO	3:00	NO
EXIT		XILENO		

FEULGEN

Soluciones

- a. Ácido clorhídrico 1 M
 Ácido clorhídrico concentrado..... 17 ml
 Agua destilada.....183 ml
- b. Reactivo de Schiff
- c. Solución de bisulfito
 Metabisulfito Potásico 10%.....30 ml
 Ácido clorhídrico 1M.....30 ml
 Agua destilada.....540 ml

Método

1. Hidratar los cortes
2. Meterlos en CIH 1M a temperatura ambiente1 min.
3. Meter las secciones en CIH 1M a 60°C 8 min.
4. Enjuagar las secciones en N-HCl a temperatura ambiente..... 1 min.
5. Transferir las secciones a al reactivo de Schiff..... 45 min.
6. Sumergir las secciones en bisulfito, solución (c)..... 2 min.
7. Repetir el lavado en bisulfito, solución (c)..... 2 min.
8. Repetir el lavado en bisulfito, solución (c)..... 2 min.
9. Lavar bien en agua destilada.
10. Contrastar si se requiere en 1% verde luz.....2 min.
11. Lavar en agua.
12. Deshidratar a través de alcoholes gradados hasta xileno y montar.

Notas

- a. El tiempo de hidrólisis es importante., y se debe usar el tiempo exacto de fijación.
- b. El M-CIH debería estar precalentado a 60°.
- c. Elías *et al.* Utilizan 5M CIH para la hidrólisis a temperatura ambiente. Pero el tiempo de hidrólisis debe ser mayor que a 60°C

Protocolo Autoteñidor (programa 7 y 8)

Paso	Estación	Reagente	Tiempo (min:seg)	Exacto
1	16	XILENO	10:00	NO
2	1	ETANOL 100%	4:00	NO
3	4	ETANOL 80%	3:00	NO
4	W1	AGUA	2:00	NO
STOP				
7	campana	CLH 1M	1:00	SI
8	campana	CLH 1M 60°C	8:00	SI
9	campana	CLH 1M	1:00	SI
10	campana	REACTIVO DE SCHIFF	45:00	SI
11	campana	BISULFITO K	2:00	SI
12	campana	BISULFITO K	2:00	SI
13	campana	BISULFITO K	2:00	SI
COMIENZO				
14	W2	AGUA	5:00	NO
15	5	ETANOL 70%	1:00	NO
16	3	ETANOL 96%	2:00	NO
17	2	ETANOL 100%	2:00	NO
18	17	XILENO	5:00	NO
19	18	XILENO	3:00	NO
EXIT		XILENO		



AZUL DE TOLUIDINA

Soluciones

Azul de Toluidina:

Azul de Toluidina 2.5 gr.
Tampón acético-acetato pH 4.2 500 ml.
Conservación indefinida

Tampón acético-acetato (pH 4.2):

Acetato sódico 0.1 M 265 ml. 500 ml para el tinte, 500 ml para lavar
Ácido acético 0.1 M 835 ml.

Solución acuosa de Molibdato Amónico

Molibdato Amónico 20 gr.
Agua 500 ml

Hay distintas maneras de hacerlo. Diluyendo el Azul de Toluidina en agua, o disolverlo en una sustancia tamponada, como tampón acético acetato .

Método

- 1- Desparafinar, no colodionar, hidratar
- 2- Teñir con azul de Toluidina 5-10 minutos
- 3- Lavar con tampón
- 4- Tratar los cortes 10 minutos con molibdato amónico
- 5 – Lavar con agua corriente
- 6- Deshidratar
- 7- Montar

Protocolo Autoteñidor (programa 3)

Paso	Estación	Reagente	Tiempo (min:seg)	Exacto
1	16	XILENO	10:00	NO
2	1	ETANOL 100%	4:00	NO
3	4	ETANOL 80%	3:00	NO
4	W2	AGUA	2:00	NO
5	8	AZUL DE TOLUIDINA	7:00	SÍ
6	15 (cub 21)	TAMPÓN	0:20	SÍ
7	14 (cub 19)	MOLIBDATO AMÓNICO	10:00	SÍ
8	W2	AGUA	10:00	NO
9	5	ETANOL 70%	1:00	NO
10	3	ETANOL 96%	2:00	NO
11	2	ETANOL 100%	2:00	NO
12	17	XILENO	5:00	NO
13	18	XILENO	3:00	NO
EXIT		XILENO		

PAS

Soluciones

Acido periodico

2.5g de acido periodico
500 ml de agua destilada

Reactivo de Schiff

Hematoxilina de Harris

Orange G-molibdico

10 g naranja G
500 ml Agua destilada
5 g ácido fosfomolibdico

Método (según Marta Muñoz)

1. Desparafinar e hidratar
2. Oxidar con Ácido periódico 1% en agua destilada (10 minutos)
3. Lavar con agua corriente (10 m). Agua destilada
4. Tratar con el Reactivo de Schiff (10 m)
5. Lavar con agua corriente (10 m). Agua destilada
6. Teñir con Hematoxilina de Groat (2 m)
7. Lavar con agua corriente (5 m)
8. Teñir con Orange G-molibdico (3 m)
9. Lavar con agua destilada
10. Deshidratar y montar

Protocolo Autoteñidor (programa 4)

Paso	Estación	Reagente	Tiempo (min:seg)	Exacto
1	16	XILENO	10:00	NO
2	1	ETANOL 100%	4:00	NO
3	4	ETANOL 80%	3:00	NO
4	W5	AGUA	2:00	NO
5	15 (cub 20)	ACIDO PERIODICO 1%	10:00	SI
6	W4	AGUA	10:00	NO
7	12	REACTIVO DE SCHIFF	10:00	SI
8	W1	AGUA	10:00	NO
9	11	HEMATOXILINA	2:00	SI
10	W2	AGUA	5:00	NO
11	10	ORANGE G	3:00	SI
12	W3	AGUA	5:00	NO
13	5	ETANOL 70%	1:00	NO
14	3	ETANOL 96%	2:00	NO
15	2	ETANOL 100%	2:00	NO
16	17	XILENO	5:00	NO
17	18	XILENO	3:00	NO
EXIT		XILENO		