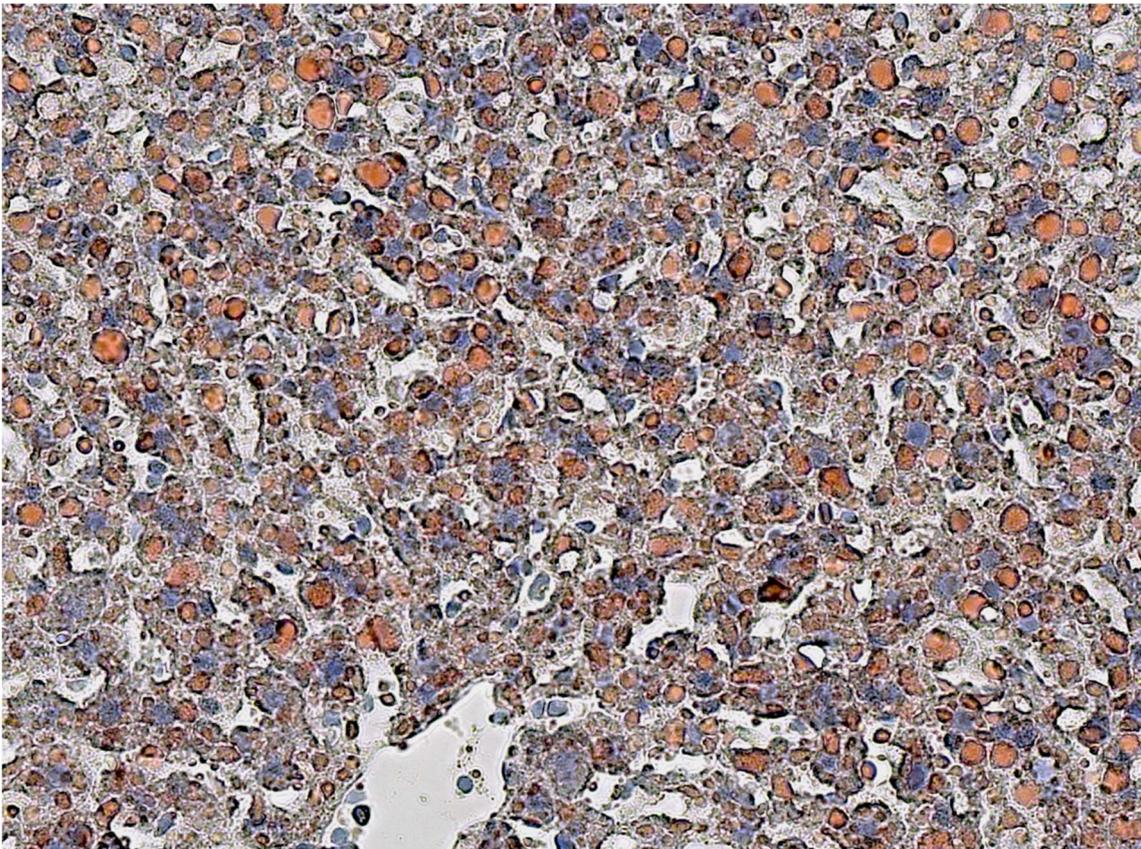


ROJO SUDAN	PAG 1
OIL RED	PAG 2
NESSLER	PAG 3
PAS	PAG 4
DHE	PAG 5
SMA CY3	PAG 6
F4/80	PAG 7
PCNA	PAG 8
SIRIUS RED	PAG 9
PRUSSIAN BLUE	PAG 10
B-CATENINA PARAFINA	PAG 11
SENESCENCIA	PAG 12
H&E	PAG 13-14
B-CATENINA FLUORESCENCIA	PAG 15
CK19	PAG 16
CASPASA 3 CLEAVED	PAG 17
F4/80 FLUORESCENCIA	PAG 18-19
KI67	PAG 20
BRDU CONGELADO	PAG 21
BRDU PARAFINA	PAG 22-23
TUNEL	PAG 24-25
IHC GENERAL	PAG 26-35
IHC PUESTA A PUNTO	PAG 36-46

Rojo Sudan

1. Cortes al criostato de 7 μ m
2. Sacar los cortes y dejar atemperar hasta que estén completamente secos.
3. Preparar la solución de Sudan:
 - a. 1.5g en 300ml isopropanol+200ml H₂O → filtrar
4. Fijar en formalina los cortes, 2'
5. Dejar en agua corriente, 5'
6. Isopropanol al 60%, 2'
7. Teñir con la solución de rojo sudan, 30'
 - a. Tapado con albal
8. Isopropanol 60%, 2'
9. Contrastar con hematoxilina de Mayer, 1'
10. Lavar en agua corriente
11. Montar con medio de montaje acuoso y sin apretar las muestras.



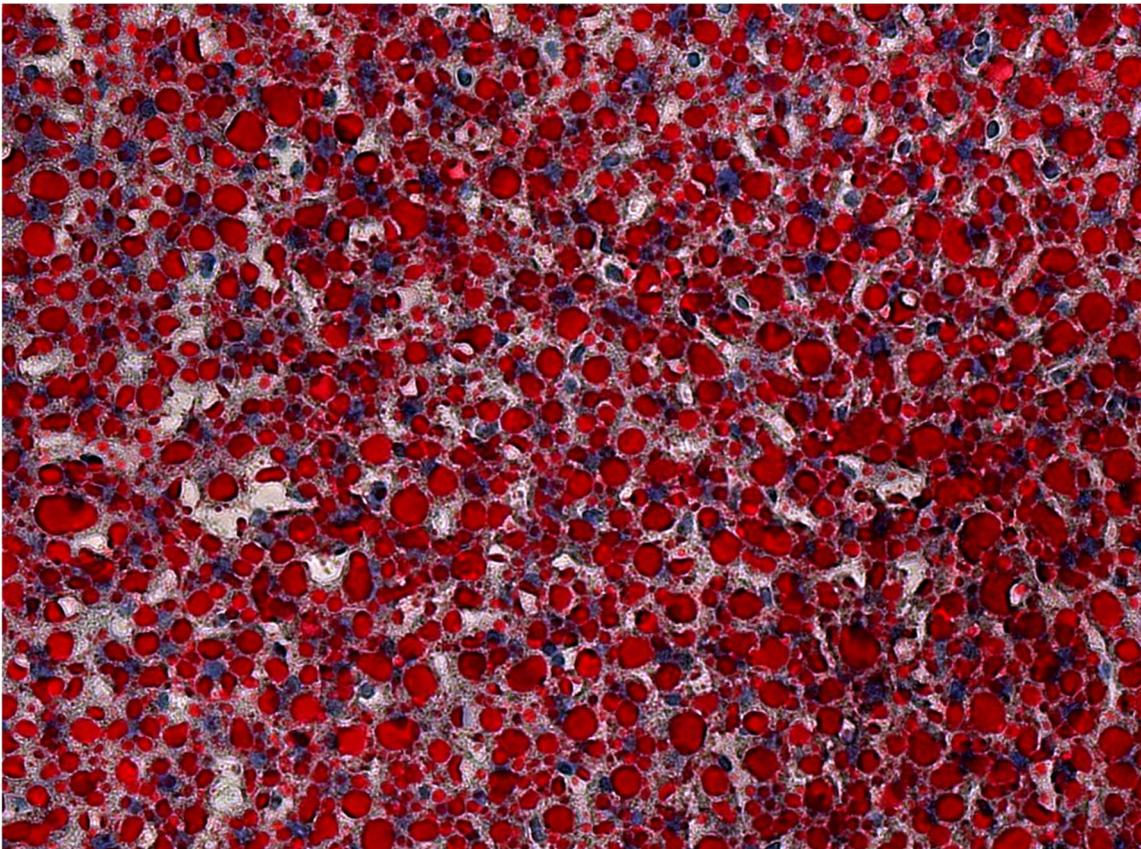
Núcleos: Azul

Lípidos: Naranja

Control positivo: Hígado con esteatosis.

Tinción Oil Red

1. Cortes al criostato de 7 μ m
2. Sacar los cortes y dejar atemperar hasta que estén completamente secos.
3. Preparar la solución de oil red:
 - a. 1.5g en 300ml isopropanol+200ml H₂O → filtrar
4. Fijar en formalina los cortes, 2'
5. Dejar en agua corriente, 5'
6. Isopropanol al 60%, 2'
7. Teñir con la solución de oil red, 15'
 - a. Tapado con albal
8. Isopropanol 60%, 2'
9. Contrastar con hematoxilina de Mayer, 1'
10. Lavar en agua corriente
11. Montar con medio de montaje acuoso y sin apretar las muestras.



Núcleos: Azul

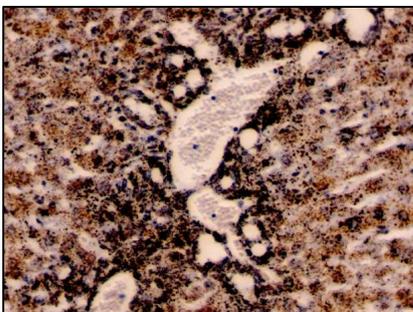
Lípidos: Rojo

Control positivo: Hígado con esteatosis.

NESSLER:

Antes de empezar dejar en la **campana de químicos** todo preparado.

- Cámaras húmedas con papel de plata dentro para que al quitar el nessler se empapen y no machen las cámaras.
 - Falcon con Mili-Q
 - Cubetas con los alcoholes
 - Cubeta con la hematoxilina de Mayer y tener los racks en la cubeta.
 - Pipetas pasteur (usar para todo)
 - Falcon de 50ml y filtro de 45µm.
 - Pap-pen
1. Cortes de 5µm de muestras incluidas en parafina al micrótopo.
 2. Estufa 58°C, 15' o dos minutos en el microondas a 600W.
 3. Histoclear, 20'
 4. Hidratar los cortes (Robot programa 2)
 - a. Etanol 100%, 5'
 - b. Etanol 96%, 5'
 - c. Etanol 70%, 5'
 - d. Etanol 96%, 5'
 - e. Etanol 70%, 5'
 - f. H₂O, 5' → se pueden quedar más tiempo
 5. Rodear el tejido con el pap-pen y echar H₂O de la cubeta anterior para que no se sequen los cortes.
 6. Resuspender el Nessler ya que precipita en el fondo.
 7. Decantar el H₂O y echar el nessler, 5' en el porta o en una cubeta.
 8. Lavar con Mili-Q dos veces durante 10 segundos (contar) agitando las muestras en agua destilada una a una o todas en una cubeta (tirar las cubetas de plástico al terminar).
 9. Teñir todas las muestras a la vez en una cubeta con hematoxilina de Mayer un minuto.
 10. Lavar con agua corriente, 30 segundos (contar)
 11. Deshidratar los cortes MANUALMENTE
 - a. Etanol 100%, 5seg
 - b. Histoclear 10 segundos.
 12. Montar con DPX.



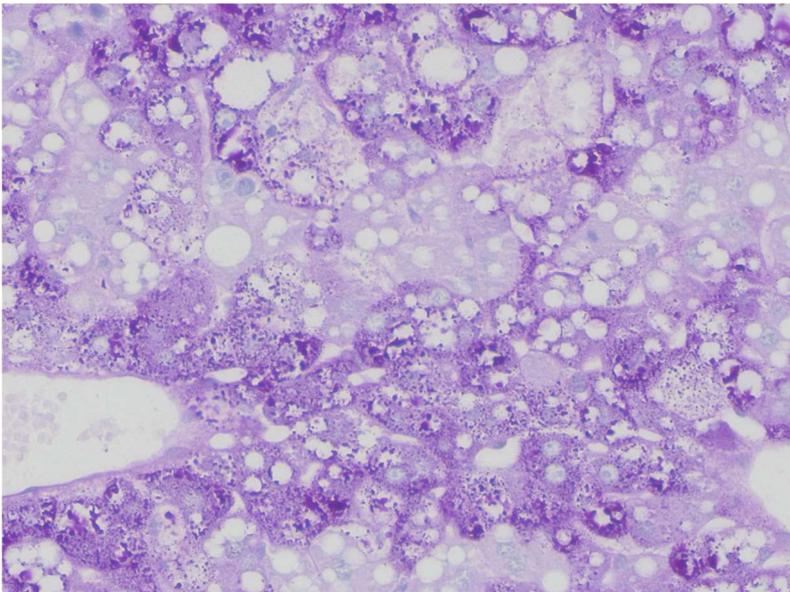
Núcleos: Azules

Amoniaco: Marrón/negro

Control positivo: Hígado BDL.

Tinción PAS

- 1- Cortar muestras de parafina a 5 micras.
- 2- Estufa a 58°C, 15' o microondas 2 minutos a 600W.
- 3- HistoClear, 20'
- 4- Hidratar mediante concentraciones decrecientes de etanol (Robot programa 2)
 - a. Etanol 100%, 5'
 - b. Etanol 96%, 5'
 - c. Etanol 70%, 5'
 - d. Etanol 96%, 5'
 - e. Etanol 70%, 5'
 - f. H₂O, 5' → se pueden quedar más tiempo
- 5- Teñir las muestras con la solución de Ácido peryódico al 1%, 10'
- 6- Introducir las muestras en H₂O
- 7- Lavar en agua corriente, 5'
- 8- Introducir las muestras en H₂O
- 9- Teñir las muestras con el Reactivo de Schiff, 20'
- 10- Introducir las muestras en H₂O
- 11- Lavar en agua corriente, 5'
- 12- Introducir las muestras en H₂O
- 13- Contrastar con hematoxilina de Mayer, 1'
- 14- Lavar en agua corriente, 5'
- 15- Deshidratar con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 100%), 30s cada uno (Robot programa 3)
- 16- Dejar en HistoClear mientras se montan
- 17- Montar con DPX.



Núcleos: Azules

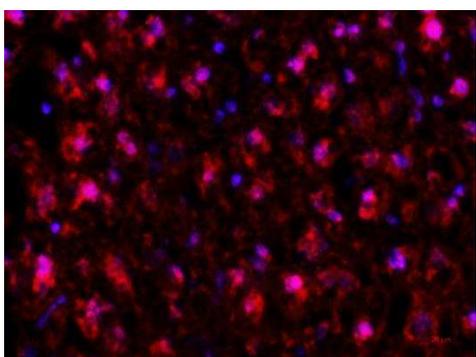
Glucógeno: Rosa

Control positivo: Hígado

DHE:

- Se realizan cortes de 8 micras en criostato y se dejan secar al aire.
- Se incuban las muestras sin fijar durante 1h con MnTBAP (sc-221954 Santa Cruz) 150 μ M a RT.
- Lavar con PBS.
- Se incuban media hora a 37°C con DHE (D-7008-10mg Sigma) 5 μ M.
- Lavar con PBS.
- Se montan con medio de montaje acuoso con DAPI.
- El DHE se tiñe en rojo (nuclear y citoplasmático), los núcleos en azul.

En 2h se va la marca.



Control positivo: Hígado con estrés oxidativo

MnTBAP

Peso molecular: 879.15

Bote: 10 mg

Disolver en 15 ml de agua destilada.

STOCK: 758.3082 micromolar

Para preparar una concentración final de 150 μ M diluimos 1,97 ml del stock hasta 10 ml de agua destilada.

Almacenar el stock a -20°C

DHE:

Peso molecular: 315.4

Bote: 10mg

Disolver en 6,34 ml de DMSO

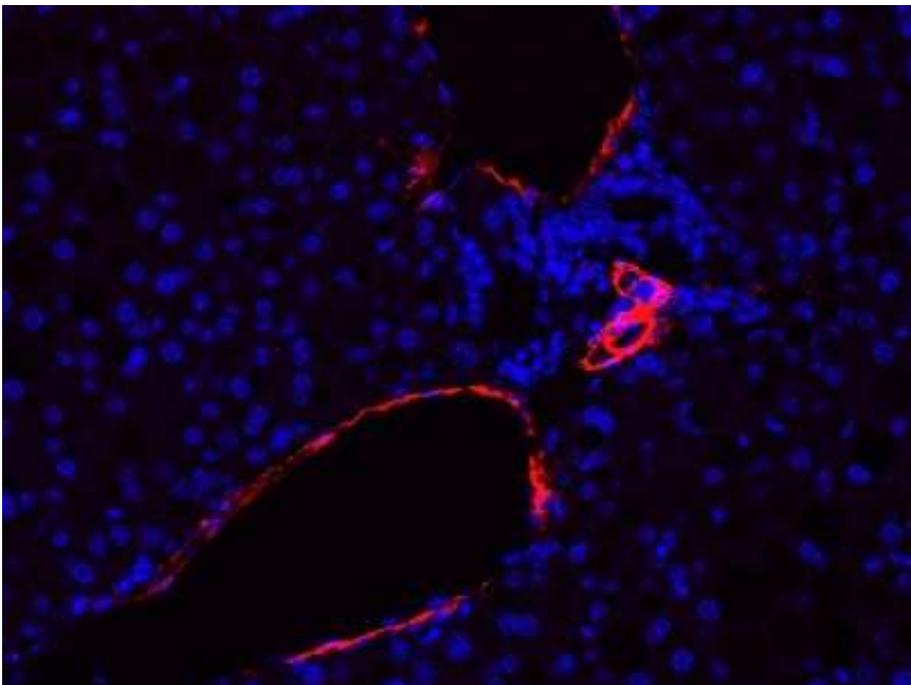
Stock: 5mM

Para preparar una concentración final de 5 μ m diluimos 1:1000 en stock.

Mantener el stock a -20°C

IF aSMA-Cy3 en parafina

- 1- Estufa a 58°C, 15' o microondas 2 minutos a 600W.
- 2- Desparafinar mediante HistoClear, 20'
- 3- Hidratar los cortes concentraciones decrecientes de etanol (Robot programa 2):
 - a. Etanol 100%, 5'
 - b. Etanol 96%, 5'
 - c. Etanol 70%, 5'
 - d. Etanol 96%, 5'
 - e. Etanol 70%, 5'
 - f. H₂Od, 5' → se pueden quedar más tiempo
- 4- Desenmascarar el antígeno con ácidos cítricos, medir pH 6 a 97°C, 20min.
 - a. Ácido cítrico 1-hidratado 5mM (Panreac, 131018.1210): 1.57g en 1,5L H₂Od
 - b. Ácido trisódico citrato 2 hidrato 5mM (Panreac, 141655.1210): 2.2g en 1,5L H₂Od
- 5- Sacarlos a una cubeta de H₂Od
- 6- Bloqueo con FAB 1:10, 1h
- 7- Lavar con PBS 1X, 5min
- 8- Bloqueo de las uniones inespecíficas con Normal Goat Serum, 30min.
- 9- Incubar con Ab 1^o 1:100 en Diluyente de anticuerpos 2 horas a 37°C.
 - a. Diluyente: 20g BSA + 1g Azida + 1L PBS 1X
- 10- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 11- Montar con medio acuoso+DAPI



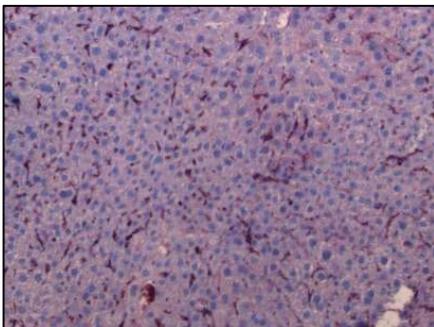
Núcleos: Azul

SMA: Rojo

Control positivo: Hígado

IHC F4/80

- 1- Estufa a 58°C, 15' o microondas 2 minutos a 600W.
- 2- Desparafinar con Histoclear, 20'
- 3- Hidratar los cortes mediante concentraciones decrecientes de etanol (Robot programa 2)
 - a. Etanol 100%, 5'
 - b. Etanol 96%, 5'
 - c. Etanol 70%, 5'
 - d. Etanol 96%, 5'
 - e. Etanol 70%, 5'
 - f. H₂O, 5' → se pueden quedar más tiempo
- 4- Bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%, 10 min.
- 5- Desenmascarar el antígeno con proteinasa K, a RT 30min.
 - a. 50µl proteinasa K en 950µl de Tris-EDTA pH8
 - b. Tris-EDTA pH8: tris base 6,10g (50nM) + 0,37g EDTA (1mM) +5ml triton (0,5%) +1L H₂O
 - c. Stock proteinase K 20X, 400 µg/mg o 12uds/ml (store -20°C): 10ml TE+ proteinase K 0,008g
- 6- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 7- Bloqueo de las uniones inespecíficas con 2,5% Normal Goat Serum (Vector, S-1012), 30min.
- 8- Incubar con Ab 1º diluido en Diluyente de anticuerpos:
 - a. Rat anti-F4/80 (bio-rad, MCA497BB), concentración 1:50, a 4°C, O.N.
 - b. Diluyente: 20g BSA + 1g Azida + 1L PBS 1X
- 9- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 10- Incubar con anti-rat *ImmPRESS® HRP-IgG Polymer Detection Kit (Vector)* a RT^a, 30min.
- 11- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 12- Revelar con *VECTOR® VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector, SK-4600)* a RT
- 13- Contrastar con hematoxilina de Mayer, 1min
- 14- Lavar con agua corriente
- 15- Deshidratar con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 100%), 30s cada uno (Robot programa 3)
- 16- Dejar en histoclear durante el montaje
- 17- Montar con DPX.



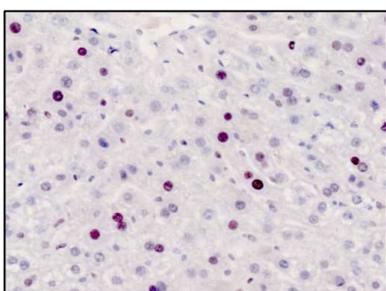
Núcleos: Azul

Macrófagos: Púrpura

Control positivo: Hígado

IHC PCNA

- 1- Estufa a 58°C, 15' o microondas 2 minutos a 600W.
- 2- Histoclear, 20'
- 3- Hidratar mediante concentraciones decrecientes de etanol (Robot programa 2)
 - a. Etanol 100%, 5'
 - b. Etanol 96%, 5'
 - c. Etanol 70%, 5'
 - d. Etanol 96%, 5'
 - e. Etanol 70%, 5'
 - f. H₂O, 5' → se pueden quedar más tiempo
- 4- Desenmascarar el antígeno con ácidos cítricos, medir pH 6 a 97°C, 20min.
 - a. Ácido cítrico 1-hidratado 5mM (Panreac, 131018.1210): 1.57g en 1,5L H₂O
 - b. Ácido trisódico citrato 2 hidrato 5mM (Panreac, 141655.1210): 2.2g en 1,5L H₂O
- 5- Sacarlos a una cubeta de H₂O
- 6- Bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%, 10min.
- 7- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 8- Bloqueo con FAB (anti-mouse), concentración 1:10 diluido en Diluyente de anticuerpos, 30min.
 - a. Diluyente: 20g BSA + 1g Azida + 1L PBS 1X
- 9- Bloqueo de las uniones inespecíficas con 2,5% Normal Goat Serum (Vector, S-1012), 30min.
- 10- Incubar con Ab 1º diluido en Diluyente de anticuerpos:
 - a. Mouse anti-PCNA (sc-25280), concentración 1:400, a 4°C, O.N.
- 11- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 12- Incubar con anti-Mouse *ImmPRESS® HRP-IgG Polymer Detection Kit (Vector)* a RT^a, 30min.
- 13- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 14- Revelar con *VECTOR® VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector, SK-4600)* a RT^a
- 15- Lavar con PBS 1X, 5min
- 16- Contrastar con hematoxilina de Mayer, 1min
- 17- Lavar con agua corriente
- 18- Deshidratar con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 100%), 30s cada uno (Robot programa 3)
- 19- Dejar en Histoclear mientras se montan
- 20- Montar con DPX.



Núcleos: Azul

PCNA: Púrpura

Control positivo: Tumor

ROJO SIRIO:

- Cortar las muestras incluidas en parafina con el microtomo (5 micras)
- Desparafinar las muestras 20 minutos en Histoclear e hidratarlas.
- Incubar las muestras en la solución I durante 20 minutos.
- Incubar las muestras en la solución II sin lavarlas durante 15 minutos.
- Deshidratar las muestras en alcohol 100% durante 5 minutos.
- Aclarar las muestras en Histoclear 10 minutos y montar con DPX.

Solución I:

0.01% Fast green FCF en solución de ácido pícrico saturado en agua destilada.

Fast Green FCF: Ref: 104022 Merck

Solution II:

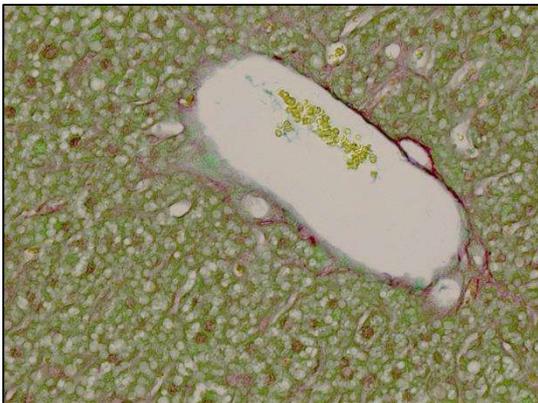
0.04% Fast green FCF/0.1% en solución de ácido pícrico saturado en agua destilada.

Sirius Red: Ref: 365548 Sigma-Aldrich

Results:

Colágeno: Rojo

Parénquima: Verde



Tinción Azul Prusia para la detección de Hierro:

Fijación: 24h en NBF 10% a temperatura ambiente.

Cortes: Cortes de 5 micras en muestras incluidas en parafina.

Reactivos:

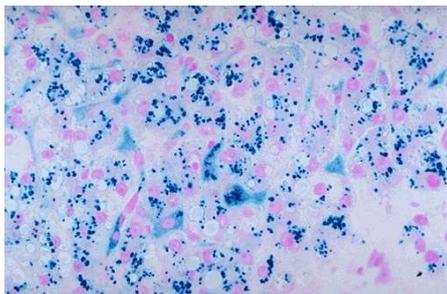
- Solucion A: 4% Solución acuosa de Potassium Ferrocyanide.
- Solucion B: 4% Solución acuosa de Hydrochloric Acid.
- Kit: polysciences Cat number: 24199

Solución de trabajo:

- Mezclar partes iguales de 4% hydrochloric acid y 4% potassium ferrocyanide justo antes de usarla.
- Solución de Rojo nuclear al 1%.

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar las muestras.
2. Sumergir las muestras en la solución de trabajo (4% hydrochloric acid y 4% potassium ferrocyanide) durante 10 minutos en dos cambios de solución (5 minutos cada cambio).
3. Lavar en agua destilada 3 veces.
4. Contrastar en la solución de rojo nuclear durante 2 minutos.
5. Lavar con agua destilada.
6. Deshidratar en alcohol 96% y dos cambios de alcohol 100% .
7. Aclarar en histoclear , 2 cambios de 5 minutos cada uno.
8. Montar con DPX.



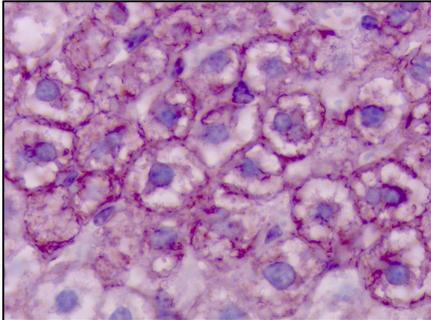
Results:

Hierro (forma férrica) -----Azul brillante
Núcleos ----- Rojo
Citoplasma----- Rosa

PROTOCOLO DE TINCIÓN IHQ B-catenina

1. Desparafinar e hidratar con el programa 2 de la máquina
2. Poner los portas en PBS.
3. Desenmascarar con buffer Citrato Ph:6, 20 minutos a 97°C en PT link o en microondas a 600W.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Lavar con PBS.
6. Secar alrededor de la muestra y rodearla con boli hidrófugo.
7. Bloquear con agua oxigenada al 3% en PBS.
8. Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en que está hecho el secundario y dejar 30 minutos.
9. Escurrir el suero, no lavar.
10. Aplicar el primario a una concentración 1:100 e incubar o.n a 4°C.
11. Lavar con PBS
12. Aplicar el anticuerpo secundario (Envision anti-rabbit) durante media hora.
13. Lavar con PBS.
14. Aplicar el substrato para peroxidasa (Vector VIP sk 4600). Observar al microscopio.
15. Lavar la muestra con PBS
16. Contrateñir los núcleos con Hematoxilina de Mayer 20 segundos.
17. Lavar con agua del grifo durante 5 minutos.
18. Deshidratar y aclarar las muestras con el programa 3 de la máquina.
19. Montar con DPX.

Anticuerpo primario: Rabbit-Beta catenina: Cell Signalling Ref: 9562S



Hígado de ratón sano

***Buffer citrato Ph:6:**

Solución A: 18ml (10,5g/500ml de Ácido cítrico 1 hidrato)

Solución B: 82ml (14,7g/500ml de Citrato de trisodio dihidratado)

Mezclar 18 ml de solución A y 82 ml de solución B y llevar a 1L con agua destilada.

Tinción de Senescencia, actividad de Beta-Galactosidasa

Fijación:

- Hacer cortes en el criostato de 10 micras y fijar 5 minutos en 4%NBF/0.5% Glutaraldehído recién preparada.
- Lavar dos veces en PBS.

Solución de tinción:

Añadir a 10 ml de buffer Citrato/Fosfato de sodio *.

- 250ul of 200mM Potassium Ferricyanide (stock= 3.3 g/50ml) (final concentration: 5mM)
- 250ul of 200mM Potassium Ferrocyanide (stock= 4.2 g/50ml) (final concentration: 5mM)
- 100ul of 200mM MgCl₂(stock= 2g/50ml) (final concentration: 2mM)
- 250ul of 6M NaCl (stock= 17.5 g/50ml) (final concentration: 150mM)
- 200ul of 50mg/ml Xgal in DMSO (final: 1mg/ml) (Dissolve XGal in DMSO to make a 50 mg/ml stock (50X), store aliquots at 200C DARK!). Add the enzyme when the buffer is warm (37°C).

*Citric acid/sodium phosphate buffer For Staining Solution

(40mM, Final pH6)

39.4ml of 0.1M citric acid (19.2 g/l, M.W. 192)

60.6ml of 0.2 M sodium phosphate (53.6 g/l heptahydrate, M.W. 268)

100ml of deionized water

Filtrar la solución de tinción antes de añadirla a las muestras.

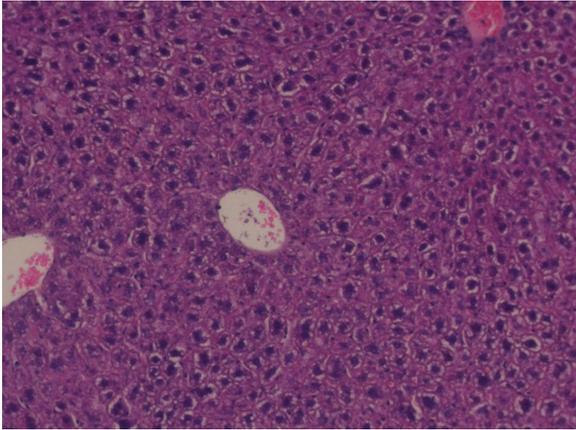
Tinción:

- Incubar las secciones con la solución de tinción en oscuridad durante 24h a 37°C en una cámara húmeda.
- Lavar con agua destilada
- Contrastar los núcleos con Rojo Nuclear durante 2 minutos.
- Lavar en agua destilada.
- Deshidratar, aclarar y montar con DPX.

HEMATOXILIN-EOSIN STAINING:

Cortar las muestras incluidas en parafina a 5 micras y teñirlas con teñidor automático.

STEP	REACTIVE	COPLIN JAR	TIME
1.	Histo-Clear	1	10 mins
2.	Histo-Clear	2	10 mins
3.	ALCOHOL 100%	3	5 mins
4.	ALCOHOL 96%	4	5 mins
5.	ALCOHOL 96%	5	5 mins
6.	ALCOHOL 70%	6	5 mins
7.	DISTILLED WATER	7	5 mins
8.	HEMATOXILINA	8	5 mins
9.	AGUA CORRIENTE	9	5 mins
10.	AGUA CLORHIDRICA 0,5% HCL	10	1 segs
11.	AGUA CORRIENTE	9	5 mins
12.	AQUEOUS EOSIN	11	15 mins
13.	AGUA CORRIENTE	9	3 mins
15.	ALCOHOL 70%	12	15 segs
16.	ALCOHOL 96%	13	15 segs
17.	ALCOHOL 100%	14	15 segs
18.	ALCOHOL 100%	15	15 segs
19.	Histo-Clear	16	5 mins
20.	Histo-Clear	17	5 mins



Results:

Nucleus: Blue

Cytoplasm: Pink

Beta catenina:

Cortes congelados de 5 micras

Fijar 10 minutos en paraformaldehído al 4%

Lavar con agua corriente 5 minutos

Bloquear media hora con la solución de bloqueo (1% BSA, 0,1% tritón, 5% suero, de cabra en PBS)

Lavar 10 minutos con PBS

Incubar durante la noche el primario en diluyente de anticuerpos DAKO 1:100

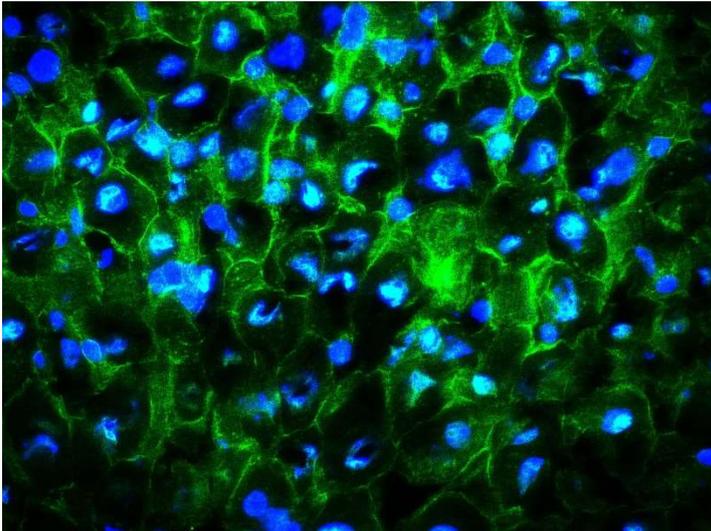
Lavar 10 minutos el primario con PBS

Incubar con anticuerpo secundario FITC anti RABBIT 1:200 con DAPI 1:1000 en diluyente de anticuerpos DAKO.

Lavar 10 minutos con PBS

Montar con medio de montaje de fluorescencia

Beta catenina: Cell Signalling Ref: 9562S



PROCOLO DE TINCIÓN IHQ CK19

1. Desparafinar e hidratar las muestras.
2. Poner los portas en PBS.
3. Secar alrededor de la muestra y rodearla con boli hidrófugo.
4. Desenmascarar las muestras con EDTA 0,01M a Ph:8 5 minutos a 800W y 15 minutos a 600w
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Lavar los portas con PBS.
7. Bloquear con agua oxigenada al 3% en PBS durante 10 minutos.
8. Lavar con PBS 10 minutos.
9. Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en que está hecho el secundario (en este caso el Vector Impress , suero de cabra) y dejar 30 minutos.
10. Escurrir el suero, no lavar.
11. Aplicar el primario a una concentración 1:200 en diluyente de anticuerpos e incubar 1h a RT
12. Lavar abundantemente con PBS durante 10 minutos.
13. Aplicar el Vector Immpress anti-Rat (MP-7404) durante media hora exactamente (un par de gotas por muestra).
14. Lavar con PBS.
15. Aplicar el substrato para peroxidada (Vector VIP sk 4600, color púrpura) o en su defecto DAB (marrón). Observar al microscopio hasta que se desarrolle el color.
16. Lavar la muestra con PBS
17. Contrateñir los núcleos con Hematoxilina de Mayer 1 minuto.
18. Lavar con agua del grifo durante 5 minutos.
19. Deshidratar y aclarar las muestras..
20. Montar con DPX.

ANTICUERPO PRIMARIO:

CK19 hybridoma bank

Concentración: 1:200

Localización: Citoplasmático. Tiñe los conductos biliares (colangiocitos).

Hígado ratón con BDL.

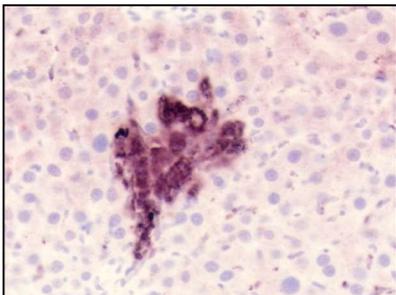


PROTOCOLO DE TINCIÓN IHO Caspasa 3

1. Desparafinar e hidratar las muestras.
2. Poner los portas en PBS.
3. Desenmascarar las muestras con un litro y medio de Buffer EDTA 0.01M Ph:8 20 min en PT link de Dako a 97°C sir hervir. En su defecto desenmascarar en un litro de Buffer EDTA 0.01M Ph:8 5 minutos a 800W y 15 minutos a 600 en microondas.
4. Dejar enfriar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Poner los portas en PBS.
6. Secar alrededor de la muestra y rodearla con boli hidrófugo.
7. Bloquear con agua oxigenada al 3% en PBS durante 10 minutos.
8. Lavar con PBS-T 10 minutos.
9. Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en que está hecho el secundario (en este caso el Envision, suero de cabra) y dejar 30 minutos.
10. Escurrir el suero, no lavar.
11. Aplicar el primario a una concentración 1:50 en diluyente de anticuerpos e incubar durante la noche a 4°C.
12. Lavar abundantemente con PBS-T durante 10 minutos.
13. Aplicar el Envision anti Rabbit durante media hora exactamente (Dako K4003).
14. Lavar con PBS.
15. Aplicar el substrato para peroxidada (Vector VIP sk 4600). Observar al microscopio hasta que se desarrolle el color.
16. Lavar la muestra con PBS
17. Contrateñir los núcleos con Hematoxilina de Mayer 20 segundos.
18. Lavar con agua del grifo durante 5 minutos.
19. Deshidratar y aclarar las muestras.
20. Montar con DPX.

ANTICUERPO PRIMARIO:

Localización: Nuclear/citoplasmático



Hígado humano.

Caspasa-3 Cleaved, Cell signaling Ref: 9661-S

Buffer EDTA 0.01M:

En un litro y medio de agua destilada añadir 1,5 ml de EDTA 0,5M y ajustar el Ph a 8.

PROTOCOLO DE TINCIÓN IHQ F4/80

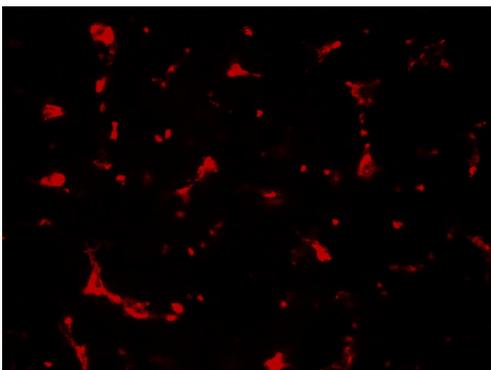
1. Desparafinar e hidratar las muestras.
2. Poner los portas en PBS.
3. Secar alrededor de la muestra y rodearla con boli hidrófugo.
4. Desenmascarar las muestras con working solution de proteinasa k durante 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar los portas con PBS.
6. Bloquear con agua oxigenada al 3% en PBS durante 10 minutos.
7. Lavar con PBS 10 minutos.
8. Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en que está hecho el secundario (en este caso el Vector Impress , suero de cabra) y dejar 30 minutos.
9. Escurrir el suero, no lavar.
10. Aplicar el primario a una concentración 1:50 en diluyente de anticuerpos e incubar 1h a 37°C.
11. Lavar abundantemente con PBS durante 10 minutos.
12. Aplicar el secundario Cy-3 anti-Rat durante media hora exactamente
13. Lavar con PBS.
14. Contrateñir los núcleos con DAPI 20 minutos.
15. Lavar abundantemente con PBS durante 5 minutos.
16. Montar con medio de montaje de fluorescencia acuoso.

ANTICUERPO PRIMARIO:

Bio RAD: Ref: MCA497BB Rat anti mouse F4/80 biotin

Concentración: 1:50

Localización: Citoplasmático. Tiñe los macrófagos del hígado.



Hígado ratón.

Proteinasa K:

TE Buffer (50mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0):

Tris Base ----- 6.10 g
EDTA ----- 0.37 g
Triton X-100 ----- 5 ml
Distilled water ----- 1000 ml

Mix to dissolve. Adjust pH 8.0 using concentrated HCl (10N HCl). Store at room temperature.

Stock proteinasa K:

Disolver 20 microlitros de proteinasa K recombinat PCR grade de Roche (ref 03115828001) por ml de TE.

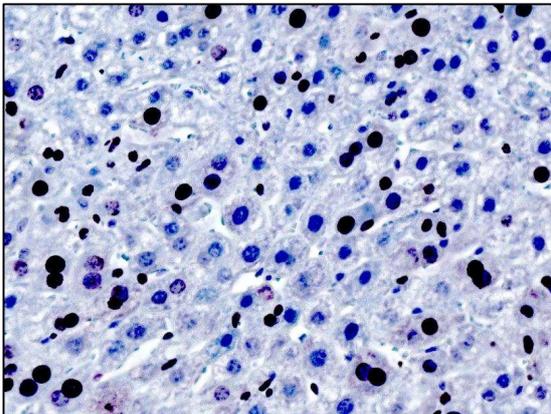
Working solution Proteinasa K:

Añadir 50 microlitros de Stock de proteinasa K a 950 microlitros de TE.

PROTOCOLO DE TINCIÓN IHO Ki67

1. Desparafinar e hidratar con el programa 2 de la máquina
2. Poner los portas en PBS.
3. Desenmascarar con buffer Citrato Ph:6 20 minutos a 97°C en PT link o en microondas.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Lavar con PBS.
6. Secar alrededor de la muestra y rodearla con boli hidrófugo.
7. Bloquear con agua oxigenada al 3% en PBS.
8. Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en que está hecho el secundario y dejar 30 minutos.
9. Escurrir el suero, no lavar.
10. Aplicar el primario a una concentración 1:1000 e incubar 1h a RT
11. Lavar con PBS
12. Aplicar el anticuerpo secundario (Envision anti-rabbit) durante media hora.
13. Lavar con PBS.
14. Aplicar el sustrato para peroxidasa (Vector VIP sk 4600). Observar al microscopio.
15. Lavar la muestra con PBS
16. Contrateñir los núcleos con Hematoxilina de Mayer 20 segundos..
17. Lavar con agua del grifo durante 5 minutos.
18. Deshidratar y aclarar las muestras con el programa 3 de la máquina.
19. Montar con DPX.

Anticuerpo primario: ABCAM Ref: ab66155



Hígado WT

***Buffer citrato Ph:6:**

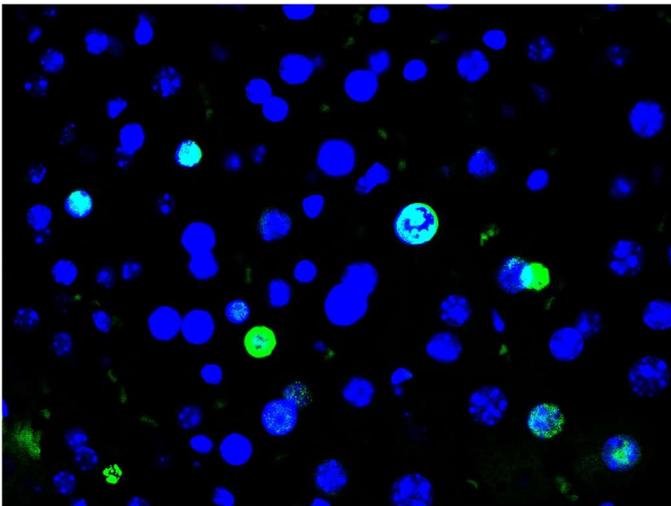
Solución A: 18ml (10,5g/500ml de Ácido cítrico 1 hidrato)

Solución B: 82ml (14,7g/500ml de Citrato de trisodio dihidratado)

Mezclar 18 ml de solución A y 82 ml de solución B y llevar a 1L con agua destilada.

IHC BRDU CONGELADO:

- 1- Hacer cortes de 7 micras en el criostato y secar al aire hasta que estén completamente secos.
- 2- Fijar con NBF 10% 5 minutos.
- 3- Desenmascarar con hcl 2m 20m 37°C
- 4- Lavarlos con PBS.
- 5- Bloqueo con FAB (anti-mouse), concentración 1:10 diluido en Diluyente de anticuerpos, 30min.
 - a. Diluyente: 20g BSA + 1g Azida + 1L PBS 1X + 0,1% tritón.
- 6- Bloqueo de las uniones inespecíficas con 2,5% Normal Goat Serum (Vector, S-1012), 30min.
- 7- Incubar con Ab 1º diluido en Diluyente de anticuerpos:
 - a. Mouse anti-BRDU (sigma b8434), concentración 1:500, a 4°C, O.N.
- 8- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 9- Incubar con FITC anti-Mouse *30 minutos. (verde)*
- 10- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 11- Contrastar con DAPI
- 12- Lavar con agua corriente
- 13- Montar con medio de montaje acuoso para fluorescencia.



Control positivo: Hígado de ratón inoculado con Brdu

Núcleos: Azul

BrdU: Verde (nuclear)

IHC BRDU PARAFINA:

- 1- Estufa a 58°C, 15' o microondas 2 minutos a 600W.
- 2- Histoclear, 20'
- 3- Hidratar mediante concentraciones decrecientes de etanol (Robot programa 2)
 - a. Etanol 100%, 5'
 - b. Etanol 96%, 5'
 - c. Etanol 70%, 5'
 - d. Etanol 96%, 5'
 - e. Etanol 70%, 5'
 - f. H₂O_d, 5' → se pueden quedar más tiempo
- 4- Desenmascarar el antígeno con ácido cítrico 20 min a 600W e incubar después 20 minutos en HCL 2N a RT.
- 5- Sacarlos a una cubeta de H₂O_d
- 6- Bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%, 10min.
- 7- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 8- Bloqueo con FAB (anti-mouse), concentración 1:10 diluido en Diluyente de anticuerpos, 30min.
 - a. Diluyente: 20g BSA + 1g Azida + 1L PBS 1X
- 9- Bloqueo de las uniones inespecíficas con 2,5% Normal Goat Serum (Vector, S-1012), 30min.
- 10- Incubar con Ab 1º diluido en Diluyente de anticuerpos:
 - a. Mouse anti-PCNA (sc-25280), concentración 1:1500, a 4°C, O.N.
- 11- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 12- Incubar con anti-Mouse *ImmPRESS® HRP-IgG Polymer Detection Kit (Vector)* a RT^a, 30min.
- 13- Lavar con PBS 1X, 5min (x3)
- 14- Revelar con *VECTOR® VIP Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector, SK-4600)* a RT^a
- 15- Lavar con PBS 1X, 5min
- 16- Contrastar con hematoxilina de Mayer, 1min
- 17- Lavar con agua corriente
- 18- Deshidratar con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96%, 100%), 30s cada uno (Robot programa 3)
- 19- Dejar en Histoclear mientras se montan
- 20- Montar con DPX.

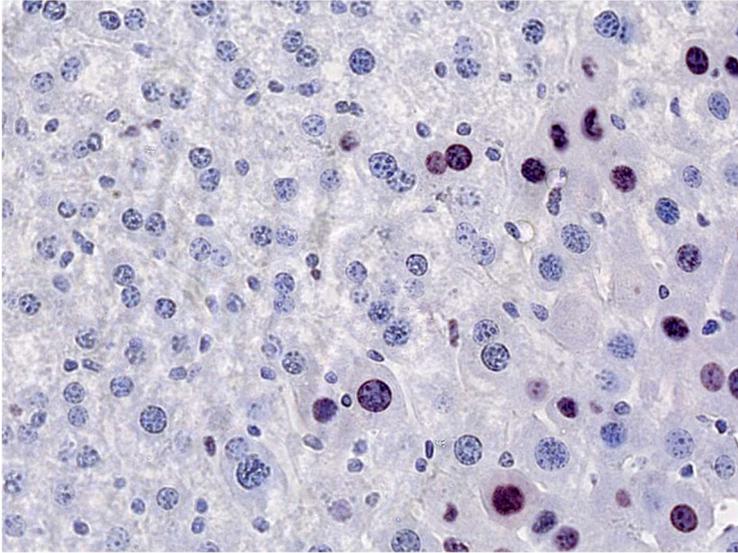
Protocolo Citrato:

Buffer citrato (10 mM citric acid, pH 6.0):

- Citric acid (anhydrous), 1.92 g
- Agua destilada, 1000 ml
- mezclar para disolver.
- Ajustar PH a 6 con NaOH 1M agitando bien la solución.

Hydrochloric Acid (HCl) Solution (2N en agua destilada, pH 0.6-0.9):

10N (concentrado) HCl ----- 20 ml
Agua destilada ----- 80 ml
Mezclar bien y el PH debe estar entre 0,6 y 0,9
Incubar las muestras a temperatura ambiente 20 minutos.



Control positivo: Hígado de ratón inoculado con Brdu

Núcleos: Azul

BrdU: púrpura.

PROTOCOLO TINCIÓN TUNEL:

- Cortar las muestras incluidas en parafina a 5 micras o incluidas en OCT a siete micras.
- Secar al aire las muestras incluidas en OCT y fijar con NBF 10% durante dos minutos.
- Desparafinar e hidratar los cortes de parafina.
- Tratar las muestras con proteinasa K durante 15 minutos a RT.
- Bloquear la peroxidasa endógena con 3% de agua oxigenada en metanol.
- Lavar las muestras con PBS.
- Incubar las muestras con la mezcla del enzima del kit de TUNEL a una concentración de 1/50 durante dos horas a 37°C.
- Montar las muestras con medio de montaje acuoso con DAPI.

Proteinase K Solution (Method 1) (20 ug/ml in TE Buffer, pH 8.0):

TE Buffer (50mM Tris Base, 1mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 8.0):

Tris Base ----- 6.10 g

EDTA ----- 0.37 g

Triton X-100 ----- 5 ml

Distilled water ----- 1000 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar el PH a 8.0 empleando HCL concentrado.
Almacenar a temperatura ambiente.

Proteinase K Stock Solution (20x, 400 ug/ml or 12 units/ml):

Proteinase K (30 units/mg) ----- 0.008 g (8 mg)

TE Buffer, pH8.0 ----- 10 ml

Glycerol ----- 10 ml

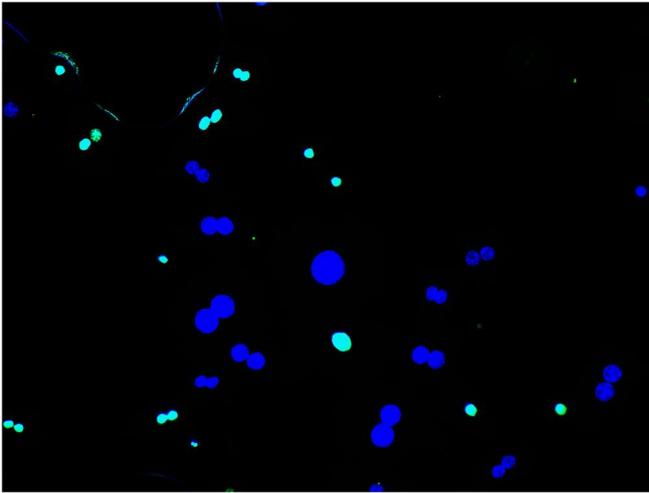
Añadir la proteinase K al buffer TE hasta que se disuelva. Añadir glicerol y mezclar bien. Alicuotar y almacenar a -20°C durante 2-3 años.

Working Solution (1x, 20 ug/ml or 0.6 units/ml):

Proteinase K Stock Solution (20x) ----- 1 ml

TE Buffer, pH8.0 ----- 19 ml

Mezclar bien, esta solución es estable durante 6 meses a 4°C.



Control positivo: Hígado de ratón.

Núcleos: Azul

BrdU: Verde (nuclear)

PROTOCOLO DE TINCIÓN IHO GENERAL EN TEJIDO DE RATÓN O HUMANO:

1. Seleccionar y emplear siempre controles positivos y negativos (incubación sin primario o tejido negativo para el anticuerpo) en cada experimento.
2. Desparafinar e hidratar con el programa 2 de la máquina
3. Poner los portas en PBS
4. Desenmascarar las muestras con buffer citrato ph:6 20 min a 97°C en el PT link con opción no boil.
5. Enfriar las muestras 20 minutos a temperatura ambiente.
6. poner las muestras en PBS
7. Secar alrededor de la muestra y rodearla con boli hidrófugo.
8. Bloquear con agua oxigenada al 3% en PBS durante 10 minutos.
9. Lavar con PBS.
10. En caso de anticuerpos hechos en mouse se realizará un bloqueo inicial antes de añadir el primario de 1h a RT con FAB anti-mouse concentración 1:10.
11. Lavar con PBS.
12. Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en que está hecho el secundario (goat o en su defecto SBF) y dejar 30 minutos.
13. Escurrir el suero, no lavar.
14. Aplicar el primario a la concentración óptima en diluyente de anticuerpos e incubar **overnight a 4°C o bien 1h a RT o 1h a 37°C.**
15. Lavar abundantemente con PBS.
16. Aplicar el Immpress anti-Rabbit de Vector referencia: MP7451 (con primario hecho en Rabbit) durante media hora/aplicar el Immpress anti-Rat de Vector referencia: MP7404 (con primario hecho en Rat) durante media hora/aplicar el Immpress anti-Rat de Vector referencia: MP7452 (con primario hecho en Mouse) durante media hora.
17. Lavar con PBS.
18. Aplicar el substrato para peroxidasa (Vector VIP sk 4600). Observar al microscopio, el color del substrato es púrpura, si se emplea DAB es marrón.
19. Lavar la muestra con PBS
20. Contrateñir los núcleos con Hematoxilina de Mayer 20 segundos.
21. Lavar con agua del grifo durante 5 minutos.
22. Deshidratar y aclarar las muestras con el programa 3 de la máquina.
23. Montar con DPX.

1. OBJETIVO

El objetivo de este PNT es describir cómo llevar a cabo la tinción inmunohistoquímica para tejidos de ratón y humano fijados en formol e incluidos en parafina con anticuerpos hechos en Rabbit, Mouse o Rat.

2. ALCANCE

Tejidos congelados y tejidos fijados e incluidos en parafina en los que se quiera llevar a cabo una tinción con Immpress.

5. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

5.1 Equipos:

- Microtomo
- Baño de parafina
- Teñidor automático
- Micropipetas
- Pipeteador automático
- Campana de extracción .
- Placa fría
- Microondas
- Microscopio

5.2 Materiales:

5.2.1 Soporte de tinción

Se utiliza un recipiente o soporte que permita poner los portaobjetos en posición horizontal y a su vez crear una cámara húmeda para las incubaciones con papel absorbente y PBS o agua destilada. Esta cámara debe poder cerrarse con objeto de crear la atmósfera adecuada para la incubación así como para evitar la evaporación del líquido que cubre la muestra. Un ejemplo es el que se muestra en la siguiente imagen (ver imagen 1):

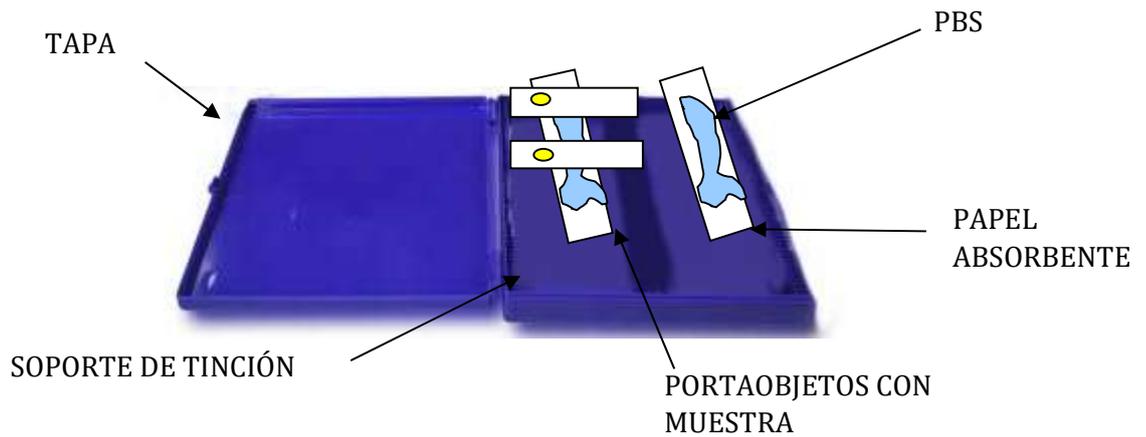


Imagen 1. Ejemplo de un soporte de tinción

5.2.2 Frasco de lavado

Se utilizará un recipiente o sistema que permita lavar los portas de manera que estos estén en posición horizontal en el soporte y que no resulte agresivo para la muestra. El líquido nunca deberá aplicarse directamente sobre la muestra sino que se añadirá en una zona sin muestra del portaobjetos de modo que al resbalar sobre el porta la lave. Ver Imagen 2:

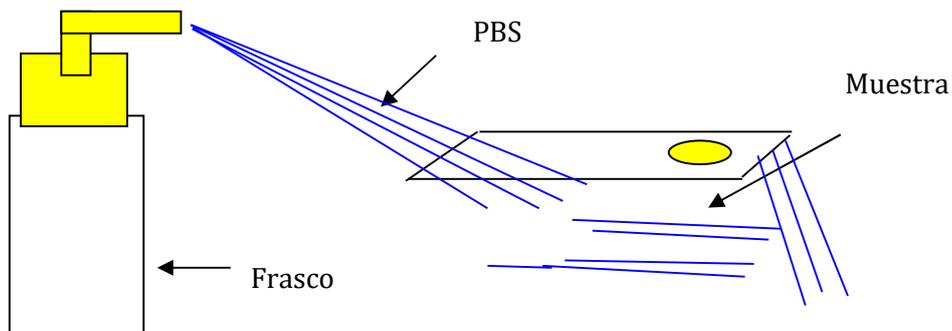


Imagen 2. Ejemplo de método de lavado de muestras.

También son adecuados los lavados con pipeta o sumergiendo los portas en un recipiente con PBS.

5.2.3 Puntas de pipeta

5.2.4 Papel absorbente

5.2.5 Portaobjetos y bolígrafo hidrófugo o portaobjetos comerciales con barrera hidrófuga.

5.2.6 Cubreobjetos

5.2.7 Tubos de 1 ml tipo Eppendorf

5.2.8 Tubos de 50 ml

5.2.9 Controles positivos para el anticuerpo PCNA;

Hígado o tejido tumoral

5.2.10 Vaso de precipitados

5.2.11 Instrucciones de kits enzimáticos y substratos

5.3 Reactivos

5.3.1 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Solución salina isotónica de PH=7.4, se prepara disolviendo una tableta comercial en el volumen apropiado de agua (para tabletas de Sigma 1 pastilla en 200ml), de modo que la solución adquiere el PH adecuado sin necesidad de ajustarlo. A pesar de todo, es aconsejable comprobar siempre el PH de la solución después de prepararla. El PBS se aplica sobre la muestra según se describe en el punto 5.2.2.

5.3.2 SBF al 5%

Suero Bovino Fetal preparado a una concentración del 5% en PBS. El SBF diluido debe cubrir completamente la muestra y tras una incubación a RT, de un intervalo entre 10 y 30 minutos, debe retirarse escurriendo el líquido, sin lavar, ya que un lavado con PBS elimina el efecto del bloqueo.

5.3.3 Diluyente de anticuerpos

Cualquier tipo de diluyente comercial o de elaboración propia, por ejemplo el diluyente de anticuerpos de DAKO es un buffer TRIS-HCL que contiene una proteína (normalmente 2% BSA) y ácida de sodio para evitar que se contamine. Siempre se debe utilizar material limpio y/o autoclavado para pipetear el diluyente para evitar posibles contaminaciones.

5.3.4 Anticuerpo primario

El anticuerpo primario es un anticuerpo de origen comercial que se une específicamente a la molécula que queremos marcar. Normalmente los anticuerpos primarios vienen con instrucciones que indican el tipo de fijación, la concentración y los tiempos de incubación recomendados. No obstante es necesario poner a punto el anticuerpo cuando se utiliza por primera vez.

5.3.5 Impress anti-Rabbi/ Mouse/Rat:

Kit comercial; está formado por un complejo de dextrano unido a peroxidasa. Se utiliza RTU (ready to use) tiempo indicada por el fabricante. El compuesto se une específicamente a anticuerpos hechos en conejo, ratón o rata por el principio de unión antígeno-anticuerpo.

5.3.7 Substrato:

Se utiliza cualquier substrato apropiado para fosfatasa alcalina o para la peroxidasa. Existen distintos colores en el mercado (rojo, azul etc.) y se prepara según las instrucciones del fabricante (4 botellas, 3 gotas de cada por cada 5ml de PBS en el caso del Vector VIP. Es muy importante prepararlo en el momento de utilizarlo y que los buffers estén al PH y concentración adecuados.

Substrato	Color	Tipo de montaje	Buffer	Referencia
Vector Vip	Purpura	Permanente	PBS Ph 7.4	SK-4600

5.3.8 Contratación

El objetivo de la contratación es poner de manifiesto los núcleos celulares de modo que nos sea posible distinguir con claridad el tejido sin marcar. Debe utilizarse un colorante que contraste con el substrato y que no lo enmascare por tener un color similar.

En la siguiente tabla se recomiendan distintos colorantes para cada substrato.

Substrato	Hematoxilina	Rojo nuclear	Verde Metilo
Vector VIP	Contraste medio	Contraste pobre	Contraste excelente

Los tiempos de tinción y tipos de contraste posibles para cada colorante se indican en la siguiente tabla:

Colorante	Tiempo	Contraste (lavado)	Preparación
Hematoxilina de Mayer	20 segundos	Agua corriente 5 minutos	Comercial
Verde Metilo	1-3 minutos	Acetona con un 0.05% de ácido acético (v/v).	Comercial

5.3.10 Soluciones de desenmascaramiento

En ocasiones es necesario desenmascarar los antígenos ya que estos, debido al fijador o a un PH inadecuados, pueden perder su configuración original y resultar indetectables para el anticuerpo primario. Para desenmascarar pueden utilizarse distintos tipos de diluciones y normalmente se calientan en el microondas con los portas sumergidos durante 20 minutos a 600W o se utiliza un sistema de desenmascaramiento como el PT link de DAKO. Al sacar el recipiente del microondas hay que dejar enfriar el contenido a temperatura ambiente ya que un cambio brusco de temperatura podría volver a enmascarar los antígenos.

Normalmente viene indicado en las instrucciones del anticuerpo primario si es necesario desenmascarar y cual es la solución de desenmascaramiento apropiada. La más habitual es:

Solución A: 18ml (10,5g/500ml de Ácido cítrico 1 hidrato)

Solución B: 82ml (14,7g/500ml de Citrato de trisodio dihidratado)

Llevar hasta un litro con agua destilada.

5.3.12 Ácido cítrico

5.3.16 Citrato de trisodio dihidratado

5.3.17 Agua oxigenada

5.3.18 Fijador (acetona, formol, paraformaldehido, Zinc)

6. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

El método permite establecer un procedimiento estándar para la tinción inmunohistoquímica con distintos anticuerpos comerciales.

La técnica es colorimétrica y se basa en el concepto de unión antígeno-anticuerpo.

El anticuerpo primario se une específicamente con la molécula que se desea marcar, a continuación se añade un anticuerpo conjugado con HRP (Envision) que se une específicamente con el primario. Para finalizar añadimos un substrato adecuado para la enzima que hemos utilizado, esto quiere decir que el substrato elegido adquiere color al entrar en contacto con el enzima y a continuación se deposita. Finalmente tendremos una marca coloreada en aquellas zonas donde ha habido unión de anticuerpo primario y por tanto donde se expresa la molécula de interés.

6.1 Identificación de portaobjetos

6.1.1 Los portaobjetos de cada bloque se rotulan inmediatamente antes de cortarlo. Se apuntará el código de bloque completo **con un lápiz de grafito**

6.2 Corte y preparación de la muestra

6.2.1 Cortar con el micrótopo los cortes necesarios de 5-8 micras utilizando portas normales o portas comerciales con poli-l-lisina o superfrost.

- 6.2.2 En el caso de los cortes de bloques de parafina desparafinar e hidratar. 10 minutos en sustituto de xileno 1, 10 minutos en sustituto de xileno 2, 5 minutos en alcohol 100%, 5 minutos alcohol 96% 1, 5 minutos alcohol 96% 2, 5 minutos alcohol 70%, 5 minutos agua destilada.
- 6.2.3 Poner los portas en un recipiente con PBS (no dejar nunca que la muestra se seque en ninguno de los pasos de la tinción inmunohistoquímica).
- 6.2.4 Colocar los portas en un soporte adecuado para la tinción inmunohistoquímica.
- 6.2.5 Lavar los portas con PBS según se describe en el apartado 5.2.2 y secar el exceso de buffer con papel absorbente o bien dejando escurrir el PBS sobre un papel de filtro.
- 6.2.6 Rodear la muestra con un bolígrafo hidrófugo en caso de no haber utilizado portas comerciales con barrera hidrófuga.
- 6.2.7 Para desenmascarar colocar los portas en el PT link que contenga 1 litro y medio de la solución A+B. Programamos la máquina durante 20 minutos a 97°C con la opción no boil activada. La máquina tarda 1 h aproximadamente en completar el proceso y dejar las muestras a 65°C.**

Transcurrido este tiempo dejamos enfriar a temperatura ambiente durante veinte minutos ya que un cambio de temperatura brusco provocaría de nuevo el enmascaramiento de los anticuerpos. Una vez enfriados, sacamos los portaobjetos y los colocamos en el soporte para tinción.

6.3 Bloqueo

- 6.3.2 Lavar la muestra con PBS.
- 6.3.4 Bloquear la peroxidasa endógena con una solución al 3% de agua oxigenada en PBS durante 10 minutos en caso de utilizar como enzima la peroxidasa.
- 6.3.5 Lavar la muestra con PBS según se describe en el apartado 5.2.2
- 6.3.6 Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en el que está hecho el secundario o en su defecto con SBF al 5% en PBS y dejar bloqueando 30 minutos.
- 6.3.7 Escurrir el SBF al 5% en PBS según se describe en el apartado 5.3.2
- 6.3.8 En caso de anticuerpos hechos en ratón, se bloqueará la muestra 1h a RT con FAB goat anti-mouse a una concentración 1:10.

6.4 Incubación con el anticuerpo primario

6.4.1 Aplicar 100-150 μ l (dependiendo del tamaño de la muestra) de la dilución de primario a una concentración adecuada (según la puesta a punto) en diluyente de anticuerpos e incubar el anticuerpo durante toda la noche a 4°C , 1h a RT o 1h a 37°C dependiendo del anticuerpo utilizado. Si este volumen no es suficiente para cubrir toda la muestra se añadirá el volumen necesario.

6.4.2 Lavar al día siguiente con PBS según se describe en el apartado 5.2.2.

6.6 Aplicación del enzima

6.6.1 Aplicar unas gotas del Impress adecuado de manera que la muestra quede cubierta, e incubar media hora.

6.6.2 Lavar con PBS según se describe en el apartado 5.2.2.

6.7 Aplicación del substrato

6.7.1 Preparar el substrato para peroxidasa elegido según se indica en el apartado 5.3.7 e incubar el tiempo recomendado; es necesario observar la muestra durante este proceso, ya que en caso de que comience a aparecer ruido de fondo en la muestra antes de que se cumplan estos tiempos, será necesario parar la reacción (siempre bajo el criterio del investigador y su experiencia en el campo). Resulta de utilidad observar la muestra bajo el microscopio cada cierto tiempo y si es posible, durante todo el proceso de revelado.

6.7.2 Lavar con PBS o agua destilada según se describe en el apartado 5.2.2.

6.8 Contratación

6.8.1 Cubrir la muestra con el colorante elegido (para peroxidasa se emplea hematoxilina de Mayer durante 10 segundos) durante el tiempo recomendado según muestra la tabla del apartado 5.3.8

6.8.2 Contrastar el colorante con la solución apropiada en caso de considerarlo necesario para una mejor visualización (en el caso de la hematoxilina de Mayer con agua corriente 5 minutos). Ver apartado 5.3.8

6.8.3 Lavar con agua corriente hasta que el agua salga limpia.

6.9 Montaje

6.9.1 Montar las preparaciones con medio de montaje permanente o bien con medio de montaje acuoso, dependiendo de las recomendaciones del fabricante del substrato. Para el montaje permanente, que es el más habitual, una vez terminada la técnica deshidratamos los portas

30 segundos en alcohol 70%, 30 segundos en alcohol 96%, 30 segundos en alcohol 100% 1, 30 segundos en alcohol 100% 2, 5 minutos en sustituto de Xileno 3 y finalmente 5 minutos en sustituto de Xileno 4. Ya que el sustituto del Xileno que empleamos no es compatible con el DPX, previamente al montaje dejamos secar las muestras al aire.

Para montar depositamos una gota de medio de montaje en un cubreobjetos y colocamos el portaobjetos sobre el presionando ligeramente para eliminar las burbujas. El medio de montaje permanente más habitual es el DPX (fluka 44581) y debe ser utilizado siempre en campana de químicos ya que es tóxico.

6.10 Etiquetado y conservación

Las muestras se etiquetarán y conservarán según PNT-Registro y archivo de muestras histológicas.

7. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Se requiere utilizar guantes y bata de laboratorio.

En el caso de utilizar DAB, desechar los residuos en el contenedor adecuado ya que se trata de un potencial carcinógeno. (DP-PNT-GEN-018)

Utilizar el DPX siempre en campana de químicos.

8. TRATAMIENTO, EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una vez aplicado el substrato, es necesario observar la muestra bajo el microscopio durante el desarrollo del color, ya que en caso de que comience a aparecer ruido de fondo en la muestra antes de que se cumplan los tiempos recomendados será necesario parar la reacción siempre bajo el criterio del investigador y su experiencia en el campo.

9. ARCHIVO DE DATOS PRIMARIOS Y RESULTADOS

La información se almacenará en el cuaderno de laboratorio y en caso de tratarse de un servicio se incluirá en la documentación que esta genere.

PUESTA A PUNTO DE ANTICUERPOS EN TEJIDO DE RATÓN Y HUMANO:

1. OBJETIVO

Descripción del método utilizado para la puesta a punto de anticuerpos comerciales para su posterior utilización en métodos inmunohistoquímicos.

2. ALCANCE

Todo tipo de anticuerpos comerciales.

3. REFERENCIAS

- PNT Microscopio
- PNT Baño de parafina
- DP-PNT-HIS-008 Teñidor automático
- PNT Micropipetas
- PNT Pipeteador automático
- DP-PNT-HIS-012 Campana de extracción
- PNT Placa fría
- PNT rojo nuclear
- PNT Registro y archivado de muestras histológicas.
- PNT Inclusión de muestras histológicas.
- PNT Hidratado de muestras histológicas
- PNT Montar preparaciones
- DP-PNT-HIS-033 Rotulación
- DP-PNT-HIS-015 microtomo de rotación HM-340E
- DP-PNT-HIS-001 corte con microtomo de tejidos incluidos en parafina
- DP-PNT-HIS-031 microtomo de congelación MYR HM505N.
- DP-PNT-HIS-017 corte de tejidos congelados con criostato
- DP-PNT-HIS-022 fijación de muestras histológicas
- DP-PNT-HIS-023 procesado automatico de muestra hasta parafina.

4. **RESPONSABILIDADES**

Personal del laboratorio de histología: Puesta a punto de anticuerpos comerciales

5. **EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

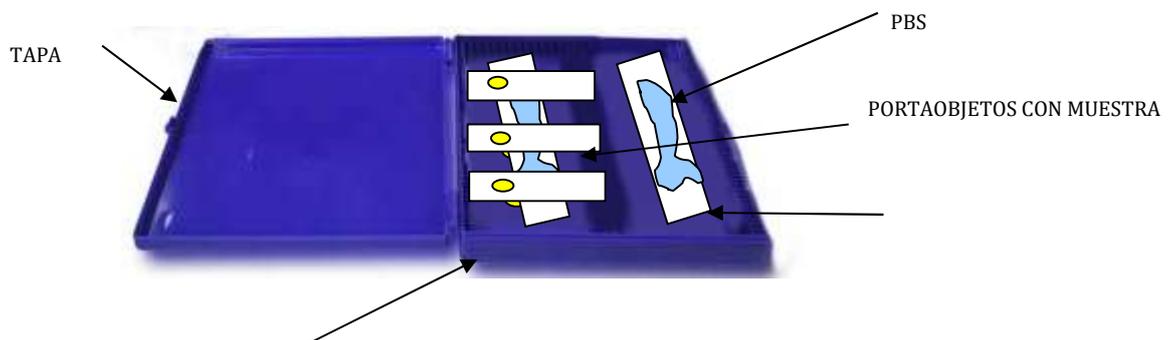
5.1 **Equipos:**

- Microtomo
- Baño de parafina
- Teñidor automático
- Micropipetas
- Pipeteador automático
- Campana de extracción
- Placa fría

5.2 **Materiales:**

5.2.1 **Soporte de tinción**

Se utiliza un recipiente o soporte que permita poner los portaobjetos en posición horizontal y a su vez crear una cámara húmeda para las incubaciones con papel absorbente y PBS o agua destilada. Esta cámara debe poder cerrarse con objeto de crear la atmósfera adecuada para la incubación así como para evitar la evaporación del líquido que cubre la muestra. Un ejemplo es el que se muestra en la siguiente imagen (ver imagen 1)



SOPORTE DE TINCIÓN

PAPEL ABSORBENTE

Imagen 1

5.2.2 Frasco de lavado

Se utilizará un recipiente o sistema que permita lavar los portas de manera que estos estén en posición horizontal en el soporte y que no resulte agresivo para la muestra. El líquido nunca deberá aplicarse directamente sobre la muestra sino que se añadirá en una zona sin muestra del portaobjetos de modo que al resbalar sobre el porta lave la muestra. Ver Imagen 2

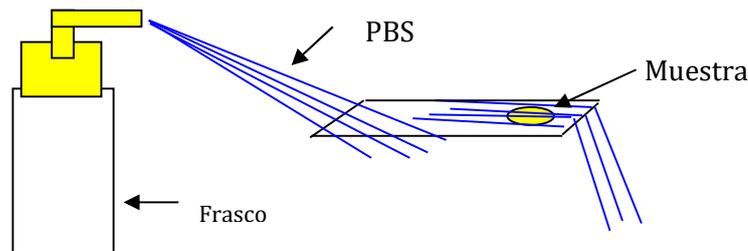


Imagen 2

También son adecuados los lavados con pipeta o sumergiendo los portas en un recipiente con PBS.

5.2.3 Puntas de pipeta

5.2.4 Papel absorbente

5.2.5 Portaobjetos y bolígrafo hidrófugo o portaobjetos comerciales con barrera hidrófuga.

5.2.6 Cubreobjetos

5.2.7 Tubos de 1 ml tipo Eppendorf

5.2.8 Tubos de 50 ml

5.2.9 Vaso de precipitados

5.3 Reactivos

5.3.1 PBS (Phosphate Buffered Saline)

Solución salina isotónica de PH=7.4; se prepara disolviendo una tableta comercial en el volumen apropiado de agua (1 pastilla para 200ml en el caso de PBS de la casa comercial Sigma) de modo que la solución adquiere el PH adecuado (pH=7.4) sin necesidad de ajustarlo. A pesar de todo es aconsejable comprobar siempre el PH de la solución

después de prepararla. El PBS se aplica sobre la muestra según se describe en el punto 5.2.2.

5.3.2 Suero Bovino Fetal (SBF) o Suero Normal (SN) al 5%

SBF o SN preparados a una concentración del 5 % en PBS. El Suero Normal, debería ser de la misma especie animal en el que se ha obtenido el anticuerpo secundario. El suero diluido debe cubrir completamente la muestra y tras una incubación a RT de un intervalo entre 10 y 30 minutos debe retirarse escurriendo el líquido, sin lavar, ya que un lavado con PBS elimina el efecto del bloqueo.

5.3.3 Diluyente de anticuerpos

Cualquier tipo de diluyente comercial o de elaboración. Por ejemplo, el diluyente de anticuerpos de DAKO es un buffer TRIS-HCL que contiene una proteína (normalmente 2% BSA) y ácida de sodio para evitar que se contamine. Siempre se debe utilizar material limpio y autoclavado para pipetear el diluyente para evitar posibles contaminaciones.

5.3.4 Anticuerpo primario

Se utiliza el anticuerpo del que queremos determinar la concentración y tiempo de incubación óptimos.

Se prepararán la dilución mínima, media y máxima del rango de diluciones recomendado por el fabricante.

Se recomienda realizar de forma paralela la inmunohistoquímica de los controles positivos y de la muestra en la que queremos testar el nuevo anticuerpo.

5.3.5 Anticuerpo secundario (complejo Immpress de Vector)

Kit comercial; está formado por un complejo de dextrano unido a peroxidasa. Se utiliza RTU (ready to use) tiempo indicada por el fabricante. El compuesto se une específicamente a anticuerpos hechos en conejo, ratón o rata por el principio de unión antígeno-anticuerpo (IMMPRESS DE VECTOR). El secundario se aplica media hora a RT.

En la siguiente tabla se muestran como debe seleccionarse el secundario en función del primario empleado.

Tejido	Primario	Secundario
Mouse	Rat anti-Mouse	Goat anti-Rat
Human	Rat anti-Human	Goat anti-Rat
Rat	Mouse anti-Rat	Goat anti-Mouse

5.3.8 Substrato:

Se utiliza cualquier substrato apropiado para la peroxidasa, existen distintos colores en el mercado (rojo, azul, etc...) y se prepara según las instrucciones del fabricante. Es muy importante prepararlo en el momento de utilizarlo y que los buffers estén al PH y concentración adecuados. En la siguiente tabla se describen los substratos utilizados habitualmente en el laboratorio con su buffer de dilución correspondientes y el tipo de montaje que precisan:

Substrato	Color	Tipo de montaje	Buffer	Referencia
Vector Blue	Azul	Acuoso	Tris-HCL 100 mM PH 8.2- 8.5	SK-5300
Vector Red	Rojo	Permanente	Tris-HCL 100 mM PH 8.2	SK-5100
Vector Vip	Purpura	Permanente	PBS	SK-4600

5.3.8 Contratación

El objetivo de la contratación es poner de manifiesto los núcleos celulares de modo que nos sea posible distinguir con claridad el tejido sin marcar. Debe utilizarse un colorante que contraste con el substrato y que no lo enmascare por tener un color similar. En la siguiente tabla se recomiendan distintos colorantes para cada substrato.

Substrato	Hematoxilina	Rojo nuclear	Verde Metilo
Vector Blue	Incompatible	Excelente contraste	Buen contraste
Vector Red	Excelente contraste	Incompatible	Excelente contrate

Los tiempos de tinción y tipos de contraste posibles para cada colorante se indican en la siguiente tabla:

Colorante	Tiempo	Contraste	Preparación
Hematoxilina	1-3 minutos	Agua corriente	Comercial
Rojo Nuclear	1-3 minutos	Agua corriente	Comercial
Verde Metilo	1-3 minutos	Acetona con un 0.05 % de ácido acético (v/v).	Comercial

5.3.11 Soluciones de desenmascaramiento

Las más comunes son las que se describen a continuación:

- **Tampón citrato PH 7,3**
Solución A: 2.5 g de ácido cítrico en 500ml de agua destilada
Solución B: 29.41 g de citrato de trisodio dihidratado en 1 L de agua destilada
Para 1 litro de solución lista para usar mezclar 2 ml de la solución A con 98 ml de la solución B en agua destilada y llevar hasta un volumen final de un litro.
- **Tampón citrato PH 6**
Solución A: 2.5 g de ácido cítrico en 500ml de agua destilada
Solución B: 29.41 g de citrato de trisodio dihidratado en 1 L de agua destilada
Para un litro de solución lista para usar mezclar 18 ml de solución a con 82 ml de solución B y llevar hasta un volumen final de un litro con agua destilada.
- **Tampón citrato PH 2,5**
Solución A: 2.5 g de ácido cítrico en 500ml de agua destilada
Solución B: 29.41 g de citrato de trisodio dihidratado en 1 L de agua destilada
Para un litro de solución lista para usar mezclar 99.6 ml de solución a con 0.4 ml de solución B y llevar hasta un volumen final de un litro con agua destilada.

- **TAMPÓN EDTA 1MM PH 9**

Se prepara una solución stock 100mM disolviendo 29.22g de EDTA en un litro de agua destilada.

Antes de utilizarla se diluye la solución stock 1/100 y se mide y ajusta el PH a 9

- **TAMPÓN TRIS-BASE 10 MM PH 10**

Se prepara una solución stock 100mM disolviendo 12.11g de Trizma-base en un litro de agua destilada.

Antes de utilizarla se diluye la solución stock 1/10 y se mide y ajusta el PH a 10

- **Tampón TRIS-EDTA-Citrato PH 7,8**

Se prepara una solución stock mezclando 5g de EDTA con 2,5g de TRIS-BASE y 3,2g de tri-natrium citrate y se lleva a un volumen final de un litro con agua destilada.

Antes de utilizarla se diluye la solución stock 1/10 y se mide y ajusta el PH a 10

- **TAMPÓN DE ÁCIDO BÓRICO 0.02 M PH 7**

Se prepara una solución stock concentrada 50 veces. Para ello se disuelven 31g de ácido bórico en 500 ml de agua destilada. Se ajusta el PH a 7 con hidróxido sódico (NaOH).

Antes de utilizarla se diluye la solución stock 1/50

5.3.12 Ácido bórico

5.3.13 Ácido cítrico

5.3.14 EDTA

5.3.15 NaOH

5.3.16 TRIS-BASE

5.3.17 Citrato de trisodio dihidratado

5.3.18 Agua oxigenada

5.3.19 Fijador (acetona, formol, Zinc)

6. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

El método consiste en utilizar diluciones del anticuerpo primario o secundario de concentración creciente, en incubaciones, a distintos tiempos, con objeto de determinar la concentración y tiempo óptimo para ese anticuerpo.

Asimismo, se determinará si es necesario algún tipo de desenmascaramiento del antígeno, ya que, en ocasiones, el fijador o su PH es demasiado agresivo para el tejido y el antígeno acaba enmascarándose (la proteína se desnaturaliza). Las soluciones de desenmascaramiento proporcionan un pH y unas condiciones adecuadas para que los antígenos queden expuestos. Normalmente cada anticuerpo tiene un método de desenmascaramiento que viene especificado en las instrucciones de la casa comercial.

Antes de comenzar una puesta a punto se realizará un esquema de pruebas basándonos en las especificaciones del anticuerpo; este esquema incluirá distintas diluciones del anticuerpo, distintos tipos de desenmascaramiento y distintos tiempos y temperaturas de incubación. Dichas pruebas se realizarán a la vez o bien de forma secuencial en función de los resultados obtenidos en los sucesivos test. Para el diseño de pruebas se empleará la plantilla de puesta a punto (F001-DP-PNT-HIS-032)

Pasos:

6.1 Identificación de portaobjetos

6.1.1 Los portaobjetos de cada bloque se rotulan inmediatamente antes de cortarlo. Se apuntará el código de bloque completo con un lápiz de grafito según DP-PNT-HIS-033.

6.2 Corte y preparación de la muestra

6.2.1 Cortar con el microtomo o criostato los cortes necesarios de 5-8 micras por duplicado según DP-PNT-HIS-015 y DP-PNT-HIS-001; DP-PNT-HIS-031 y DP-PNT-HIS-017, utilizando portas normales o portas comerciales con barrera hidrófuga. Los bloques de parafina se obtuvieron según DP-PNT-HIS-022, DP-PNT-HIS-023 y PNT-Inclusión de muestras histológicas.

6.2.2 En el caso de los cortes de bloques de parafina desparafinar e hidratar según PNT-hidratado de muestras histológicas; en el caso de cortes congelados dejar secar al aire después de cortar, fijarlos con un fijador adecuado (por ejemplo acetona fría, formol, Zinc...) y pasar al punto 6.2.3

6.2.3 Poner los portas en un recipiente con PBS (no dejar nunca que la muestra se seque en ninguno de los pasos de la tinción inmunohistoquímica).

6.2.4 Colocar los portas en un soporte adecuado para la tinción inmunohistoquímica.

6.2.5 Lavar los portas con PBS según se describe en el apartado 5.2.2 y secar el exceso de buffer con papel absorbente o bien dejando escurrir el PBS sobre un papel de filtro.

6.2.6 Rodear los portas con un bolígrafo hidrófugo en caso de no haber utilizado portas comerciales con barrera hidrófuga.

6.2.7 En caso de que sea necesario desenmascarar el anticuerpo que estamos testando pondremos los portas en un vaso de precipitados que contenga la solución recomendada por el fabricante del anticuerpo o aquella solución o soluciones que hayamos seleccionado. Metemos el vaso de precipitados en el micro-ondas y calentamos a 600 vatios durante 20 minutos. Esta operación la repetiremos cada vez que utilicemos una solución nueva de desenmascaramiento.

Transcurrido este tiempo sacamos el vaso de precipitados y lo dejamos enfriar a temperatura ambiente ya que un cambio de temperatura brusco provocaría de nuevo el enmascaramiento de los anticuerpos. Una vez enfriados, sacamos lo portaobjetos y los colocamos en el soporte para tinción.

6.3 Bloqueo

6.3.1 Bloquear durante 1h los epítomos de ratón con una fracción FAB si nuestro tejido es de ratón y el anticuerpo secundario es anti-mouse. Ocurriría lo mismo en caso de que nuestro secundario fuese anti-rata y nuestro tejido rata.

6.3.2 Lavar la muestra con PBS.

6.3.4 Bloquear la peroxidasa endógena con una solución al 3% de agua oxigenada en PBS durante 10 minutos en caso de utilizar como enzima la peroxidasa.

6.3.5 Lavar la muestra con PBS según se describe en el apartado 5.2.2

6.3.6 Cubrir la muestra con suero al 5% en PBS del animal en el que está hecho el secundario o en su defecto con SBF al 5% en PBS y dejar bloqueando entre 10 y 30 minutos.

6.3.7 Escurrir el suero al 5% en PBS.

6.4 Incubación con el anticuerpo primario

6.4.1 Aplicar 100µl de las diluciones de primario seleccionadas (normalmente se seleccionan diluciones un poco por debajo y un poco por encima del rango recomendado por el fabricante). Incubar durante los tiempos y a las temperaturas seleccionadas en el esquema de puesta a punto. Si el volumen de anticuerpo no es suficiente para cubrir toda la muestra se añadirá el volumen necesario. Si tras una incubación a una hora se sospecha que el tiempo de incubación no es suficiente se incubarán las muestras durante la noche a 4 °C.

6.4.2 Lavar con PBS según se describe en el apartado 5.2.2.

6.5 Incubación con el anticuerpo secundario

6.5.1 Aplicar una gota del complejo Envision-peroxidasa e incubar media hora. Si este volumen no es suficiente para cubrir toda la muestra se añadirá el volumen necesario.

6.5.2 Después de media hora de incubación con Immpress, lavar con PBS y preparar el substrato según las instrucciones del fabricante.

6.5.3 Lavar con PBS según se describe en el apartado 5.2.2.

6.7 Aplicación del substrato

6.7.1 Preparar el sustrato para peroxidasa según se indica en el apartado 5.3.7 e incubar el tiempo recomendado (normalmente entre 3 y 5 minutos es suficiente para un buen desarrollo del color); aun así, es recomendable observar la muestra durante este proceso, ya que en caso de que comience a aparecer ruido de fondo en la muestra antes de que se cumplan estos tiempos, será necesario parar la reacción siempre bajo el criterio del investigador y su experiencia en el campo. Resulta de utilidad observar la muestra bajo el microscopio cada cierto tiempo, aunque normalmente puede apreciarse a simple vista.

6.7.2 Lavar con PBS o agua destilada según se describe en el apartado 5.2.2.

6.8 Contratinción

6.8.1 Cubrir la muestra con el colorante elegido durante el tiempo recomendado según muestra la tabla del apartado 5.3.8.

6.8.2 Contrastar el colorante con la solución apropiada en caso de considerarlo necesario para una mejor visualización. Ver apartado 5.3.8.

6.8.3 Lavar con agua corriente hasta que el agua salga limpia.

6.9 Montaje

Montar las preparaciones según PNT o bien con medio de montaje acuoso, dependiendo de las recomendaciones del fabricante del substrato. Para el montaje acuoso, una vez terminada la técnica depositamos una gota de medio de montaje acuoso en un cubreobjetos y colocamos el portaobjetos sobre el presionando ligeramente para eliminar las burbujas.

6.10 Etiquetado y conservación

Las muestras se etiquetarán y conservarán según PNT-Registro y archivado de muestras histológicas.

7. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

Se requiere utilizar guantes y bata de laboratorio.

8. TRATAMIENTO, EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para dar la técnica por válida se deberá obtener marcaje en el control positivo según el patrón esperado. La intensidad de marca debe ser la adecuada y debe haber ausencia de ruido de fondo en la muestra en la medida de lo posible.

9. ARCHIVO DE DATOS PRIMARIOS Y RESULTADOS

Los resultados de la puesta a punto se registrarán a mano en el registro de resultados de puesta a punto (R001-DP-PNT-HIS-032), ubicado en el servidor de Histología.

