

Atlas de Histología Vegetal y Animal

Técnicas histológicas

RECETAS

Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Fcaultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Octubre 2018)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs2.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1 Preparación de alcoholes	1
2 Fijador Bouin	2
3 Fijador Carnoy	3
4 Fijador FAA (formaldehído, alcohol, acético)	4
5 Fijador paraformaldehído tamponado	5
6 Fijador PLP (periyodato, lisina, formaldehído)	6
7 Colorante azul alcían	7
8 Colorante azul de toluidina	8
9 Colorante fucsina escarlata	9
10 Colorante hematoxilina de Carazzi	10
11 Colorante hematoxilina de Ehrlich	11
12 Colorante hematoxilina de Gill	12
13 Colorante hematoxilina de Harris	13
14 Colorante hematoxilina de Mayer	14
15 Colorante hematoxilina de Weigert	15
16 Colorante picrofucsina de van Gieson	16
17 Colorante reactivo de Schiff	17
18 Colorante rojo neutro	18

19 Colorante safranina	19
20 Colorante verde luz / rápido	20
21 Colorante violeta de cresilo	21

1 Preparación de alcoholes

Preparación de etanol de diferente gradación a partir de etanol de 96°, según la tabla de diluciones Gay Lussac (Langeron, 1949).

Procedimiento

A 100 ml de etanol de 96° han de añadirse las siguientes cantidades de agua destilada para preparar las diferentes graduaciones de etanol:

30°	227.70 ml
40°	147.22 ml
50°	98.15 ml
60°	64.92 ml
70°	40.85 ml
80°	22.45 ml
90°	7.73 ml

Productos

Etanol 96°

Agua destilada

Material

Probeta

2 Fijador Bouin

El Bouin es una mezcla fijadora descrita inicialmente por Pol Andre Bouin a finales del siglo XIX. Es muy utilizada en histología en tejidos incluidos en parafina y para la realización de tinciones comunes, por ejemplo en histopatología. Es muy útil para tejidos blandos y embriones, y preserva bien el núcleo y el glucógeno. También actúa como mordiente que ayuda a la tinción con determinados colorantes. Su capacidad fijadora se basa en la acción del ácido pícrico, que provoca precipitación de moléculas, y del formaldehído, que forma entrecruzamientos entre proteínas del tejido.

Procedimiento

Solución saturada de ácido pícrico .. 15
 Formol 5 partes
 Ácido acético 1 parte

Soluciones

Solución saturada de ácido pícrico: añadir ácido pícrico sólido a un litro de H₂O destilada. Dejar disolver durante un día o dos de manera que el agua se sature sin que se llegue a disolver todo el ácido pícrico añadido. Una vez saturada el H₂O con el ácido pícrico se coge el volumen necesario para preparar la solución fijadora, con cuidado de no remover el fondo donde se encuentra el ácido pícrico sólido no disuelto.

Se puede añadir un volumen de H₂O destilada igual al sacado tras cada uso, siempre que quede ácido pícrico sólido en el fondo del recipiente. Si éste desaparece se añade más ácido pícrico sólido.

La solución saturada de ácido pícrico se puede mantener durante meses.

Formol: formaldehído al 37-40

Consejos

La solución de Bouin se puede mantener almacenada mucho tiempo, siempre que esté herméticamente cerrado el recipiente que la contiene.

Hay que tener cuidado con el tiempo de fijación, que no debe exceder de 48 h en el caso de fijaciones por inmersión. Tras la fijación las muestras de tejido se pueden conservar en alcohol de 70°. No está recomendado para el riñón ni para el estudio de mitocondrias.

Antes de la inclusión en parafina es conveniente eliminar el ácido pícrico de la muestra mediante lavados en etanol de 70° porque puede impedir una buena inclusión o que las tinciones no sean adecuadas.

Ver la hoja de seguridad del ácido pícrico puesto que puede ser explosivo bajo ciertas circunstancias.

Productos

Formaldehído
 Ácido pícrico
 Ácido acético
 Agua destilada

Material

Probeta
 Bote con cierre hermético
 Vaso de precipitado

3 Fijador Carnoy

La solución de Carnoy es un fijador ampliamente usado en histología tanto de animales como de plantas. Es un fijador ácido especialmente indicado para preservar ácidos nucleicos (núcleos, cromatina, grupos de Nissl) y glucógeno. También es útil para la preservación de las proteínas fibrosas. Es de acción muy rápida gracias al cloroformo y es por ello recomendado para acortar tiempos de fijación (1 hora aproximadamente) y, además, la propia fijación deshidrata la muestra. Así, tras la fijación y unos cortos baños en etanol absoluto se puede proceder a la inclusión.

Como todos los fijadores alcohólicos puede producir retracciones citoplasmáticas y lisis de algunos orgánulos como las mitocondrias, aunque la acción del acético y el cloroformo contrarrestan en cierta medida estas retracciones. También lisa los eritrocitos y disuelve los lípidos. La capacidad para disolver las grasas permite una penetración rápida del fijador. Tiempos largos de fijación producen endurecimiento del tejido.

Procedimiento

Etanol 60 ml

Cloroformo 30 ml

Ácido acético 10 ml

Consejos

Es conveniente preparar la solución poco tiempo antes de usar.

Productos

Etanol

Cloroformo

Ácido acético

Material

Probeta

Bote con cierre hermético

4 Fijador FAA (formaldehído, alcohol, acético)

Los fijadores son moléculas o mezclas de moléculas en solución que se usan para preservar las características tisulares lo más parecido posible a su estado vivo. Permiten que las muestras de tejidos sean conservadas o procesadas en las diversas técnicas histológicas sin deteriorarse. Existen multitud de fijadores, cada uno con características propias, y se eligen en función del tratamiento posterior o de lo que queramos poner de manifiesto.

La solución fijadora FAA (formaldehído, alcohol, acético) se emplea normalmente en la fijación de tejidos vegetales. Aunque no preserva muy bien el citoplasma es un buen fijador para conservar las estructuras vegetales.

Procedimiento

Etanol 50 ml

Ácido acético glacial 5 ml

Formol 10 ml

Agua destilada 35 cc

Soluciones

Formol: formaldehído al 37-40 % en H₂O destilada.

Consejos

Las muestras pequeñas como hojas finas han de fijarse durante 12 h, mientras que hojas gruesas o troncos pequeños durante 24 h.

Es conveniente fijar los tejidos vegetales en vacío. De esta manera se elimina el aire del tejido a la vez que se favorece que penetre el fijador en todas las células. Ésta es una recomendación general para cualquier fijación de tejidos vegetales.

Productos

Etanol

Formaldehído

Ácido acético

Agua destilada

Material

Probeta

Bote con cierre hermético

5 Fijador paraformaldehído tamponado

El formaldehído es el fijador por excelencia en la mayoría de las técnicas histológicas. Se emplea como formol (formaldehído al 10%) en fijadores como el BOUIN, el FFA o PLP, o sólo como formaldehído al 4 % tamponado. Sin embargo, es recomendable el uso de formaldehído preparado fresco para evitar su oxidación. Por ello, actualmente es frecuente usar fijadores con formaldehído al 4 % tamponado, pero preparado a partir paraformaldehído. El paraformaldehído es un polímero de formaldehído que se obtiene sólido. Para obtener la solución fijadora de trabajo es necesario disolver el paraformaldehído.

Procedimiento

Paraformaldehído 4 g
 Tampón fosfato 0.4 M pH 7.4 25 ml
 Hidróxido sódico 10 N unas gotas
 H₂O destilada hasta 75 ml

Preparación

Para 100 ml.

1. Calentar 60-70 ml de agua a 60° en un matraz con un agitador magnético.
2. Añadir 4 g de paraformaldehído.
3. Añadir dos o tres gotas de hidróxido sódico 10 N.
4. Esperar a que la solución se vuelva transparente.
5. Filtrar.
6. Añadir 25 ml de tampón fosfato 0.4M pH 7.4
7. Enrasar con agua destilada hasta 100 ml.
8. Enfriar a 4-10° antes de usar.

El resultado es 100 ml de formaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M pH 7.4.

Consejos

El formaldehído preserva los lípidos pero es mucho más efectivo en esto cuando se añaden iones de calcio a la solución. El calcio disminuye la disolución de los fosfolípidos los fosfolípidos.

El formaldehído no reacciona con los carbohidratos y por ello se pueden perder cantidades importantes de glucógeno y glicosaminoglicanos.

El formaldehído tamponado se puede usar para tejidos destinado a su observación con microscopía electrónica cuando se le añade glutaraldehído (0.5-3%). En algunos casos se le puede añadir también ácido pícrico.

La calidad de la tinción se puede mejorar mediante la adición de lisina (ver fijador PLP), ciclohexilamina o fenol, con lo que se pueden conseguir calidades de tejido similares a las aportadas por el glutaraldehído.

Se pueden emplear soluciones de paraformaldehído con ligeras variaciones y secuencialmente. Por ejemplo, se ha recomendado una fijación inicial de 4 % de paraformaldehído con 2 % fenol a pH 7, seguida por una fijación con los mismos componentes pero con pH 5.5.

Productos

Paraformaldehído
 Cloroformo
 Hidróxido sódico 10 N
 Tampón fosfato 0.4 M pH 7.4
 Agua destilada

Material

Probeta
 Embudo
 Filtro papel
 Agitador magnético
 Agitador con plancha calefactora

6 Fijador PLP (periyodato, lisina, formaldehído)

Los fijadores son moléculas o mezclas de moléculas en solución que se usan para preservar las características tisulares lo más parecido posible a su estado vivo. Permiten que las muestras de tejidos sean conservadas o procesadas en las diversas técnicas histológicas sin deteriorarse. Existen multitud de fijadores, cada uno con características propias, y se eligen en función del tratamiento posterior o de lo que queramos poner de manifiesto.

La solución fijadora PLP (periyodato, lisina, formaldehído) se emplea cuando se quiere una alta preservación de antígenos puesto que su principal capacidad de fijación se centra en los carbohidratos. Contiene periyodato sódico que oxida a los azúcares para formar aldehídos y la lisina forma puentes entre ellos, produciendo la fijación. El paraformaldehído se usa en bajas concentraciones para estabilizar el tejido. Es un fijador que, además de preservar la antigenicidad, mantiene la estructura de las membranas en unas condiciones tan buenas que se puede usar como fijador para muestras destinadas a microscopía electrónica.

Procedimiento

- Preparación de solución A: a una solución de lisina-HCl 0.2 M se le añade fosfato disódico dibásico 0.1 M hasta que el pH sea 7.4. La solución se diluye en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.4 hasta que la concentración de lisina-HCl alcance 0.1 M.

- Preparación de solución B: paraformaldehído al 8 % en H₂O destilada.

Preparación de solución fijadora: mezclar 3 partes de la solución A con 1 de la solución B y añadir metaperiyodato sódico sólido hasta alcanzar una concentración final del 0.01M

Soluciones

Lisina-HCl: solución 0.2 M en H₂O destilada.

Fosfato disódico dibásico: solución 0.1 M en H₂O destilada.

Tampón de fosfato sódico: solución 0.1 M en H₂O

destilada, pH 7.4.

Paraformaldehído: solución al 8 % en H₂O destilada.

Consejos

Es importante añadir los productos y soluciones en el orden indicado.

Productos

Lisina-HCl

Fosfato disódico dibásico (Na₂HPO₄)

Tampón fosfato sódico

Paraformaldehído

Metaperiyodato sódico (NaIO₄)

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Medidor de pH

Agitador magnético / placa térmica

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

7 Colorante azul alción

El azul alción (azul alción 8GS C.I. 74240) es un colorante de carácter básico compuesto por una serie de isómeros de tetrametil tioisouronio. Se usa sobre todo para la detección de carbohidratos en procesos histoquímicos en tejidos animales, y para la tinción de paredes celulares primarias en las plantas. El color azul es debido al cobre que posee la molécula.

Procedimiento

Azul alción (C.I. 74240)..... 1 g
Ácido acético glacial 3 ml
Agua destilada 97 ml

Consejos

Hay que agitar bien la solución y se puede mantener útil durante años. Ya que este colorante actúa óptimamente a pH próximo a 2.5, se puede ajustar el pH mediante la adición de ácido acético.

Productos

Azul alción (C.I. 74240)

Ácido acético glacial

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

8 Colorante azul de toluidina

El azul de toluidina (C.I. 52040) es un colorante catiónico que se puede usar en tinciones generales. Se ha empleado para teñir matrix extracelular, sobre todo en cartilago pues pone de manifiesto proteoglicanos y glicosaminoglicanos, también para estudiar osteoblastos, mastocitos, botones gustativos, cromosomas y otros. Presenta metacromasia. Esta metacromasia es útil en los tejidos vegetales puesto que distingue las paredes celulares primarias de las secundarias. Molecularmente es una tiazina.

Procedimiento

Azul de toluidina (C.I. 52040)..... 0.5 g
 Ácido acético glacial 1 ml
 Agua destilada o tampón acetato pH 4 99 ml

Consejos

El pH óptimo de trabajo puede variar entre 3 y 5.5, dependiendo del fijador y tipo de tejido. El tiempo de tinción es de unos 3 minutos. La deshidratación ha de ser rápida empezando con el alcohol de 95° puesto que el colorante se puede perder durante estos pasos.

Hay una solución para mantener el color durante la deshidratación y es convertirlo en molibdato insoluble. Esto se puede hacer sumergiendo las secciones recién teñidas con azul de metileno, y lavadas en agua destilada, en molibdato de amonio al 5 % en solución acuosa durante 5 min. Tras lavar ya se puede deshidratar sin problema.

Los núcleos y los carbohidratos se tiñen de azul, aunque presenta metacromasia para algunas estructuras celulares.

Productos

Azul de toluidina (C.I. 52040)

Ácido acético glacial

Tampón acetato

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Medidor de pH

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

9 Colorante fucsina escarlata

La fucsina escarlata o fucsina ácida - escarlata de Biebrich- es una mezcla basada en la fucsina, colorante de color magenta que se usa normalmente en tinciones tricrómicas como Masson.

Procedimiento

Escarlata de Biebrich (C.I. 26905) . 90 ml al 0.1 %

Fucsina ácida 9 ml al 1 %

Ácido acético glacial..... 1 ml

Productos

Agua destilada

Escarlata de Biebrich (C.I. 26905)

Fucsina

Ácido acético

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético / placa térmica

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

10 Colorante hematoxilina de Carazzi

La hematoxilina de Carazzi es una buena tinción nuclear que proporciona poca tinción de fondo. Se puede emplear en tinciones generales junto con la eosina. Es un protocolo que se suele utilizar para una tinción progresiva.

Procedimiento

Agua destilada	800 ml
Glicerol	200 ml
Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290) ..	1 g
Yodato de sodio	0.2 g
Alumbre de potasio	50 g

Preparación

Combinar la hematoxilina con el glicerol. Disolver el yodato de sodio en un poco de agua. Preparar el alumbre en el resto. Mezclar las soluciones de hematoxilina y de alumbre y entonces añadir poco a poco el yodato de sodio. Filtrar

La solución se puede usar inmediatamente y es estable durante meses.

Consejos

Es una tinción progresiva que produce poca tinción de fondo.

En secciones por congelación se recomienda una doble tinción.

Productos

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)

Glicerol

Yodato sódico (NaIO₃)

Alumbre de potasio (sulfato aluminico de potasio)

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético de cristal oscuro

11 Colorante hematoxilina de Ehrlich

La hematoxilina (del griego haimatus: sangre y xilon: madera) es un componente natural obtenido de una planta leguminosa (*Haematoxylum campechianum*). La hematoxilina tiene que ser oxidada a hemateína antes de ser usada como colorante y combinada con un metal que actuará como mordiente. La oxidación puede ser química o por el oxígeno mediante el envejecimiento de la solución. Es el producto oxidado de la hematoxilina, la hemateína, la que realmente se adhiere a las sustancias ácidas del tejido. Fundamentalmente tiñe el núcleo. La hematoxilina, la hemateína como colorante, es un componente de la tinción hematoxilina y eosina, probablemente la tinción general más usada en tinciones histológicas, pero también de otras tinciones como las tricrómicas donde se precisa teñir núcleos.

Procedimiento

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)	6 g
Etanol 100°	300 ml
Agua destilada	300 ml
Glicerol	300 ml
Ácido acético glacial	30 ml
Sulfato de aluminio y potasio o amonio (alumbre de potasio o aluminio)	30 g
Yodato sódico	0.9 g

Consejos

Disolver la hematoxilina en el etanol antes de añadir los otros ingredientes en el orden que aparece en la receta. Mezclar durante toda la noche.

El yodato sódico se añade para una oxidación rápida y poder usar la solución tras su mezcla. Pero se puede obviar y esperar a que la hematoxilina se oxide por sí sola, lo que puede tardar unos 2 meses. Esto último es más lento pero la solución es más tiempo útil, pudiéndose usar durante varios años.

La cantidad de alumbre de potasio o aluminio es orientativa puesto que este componente debe estar saturado en la solución. En realidad, es suficiente

cuando aparece precipitado en el fondo del recipiente, lo que indica que la solución está saturada.

El tiempo de tinción puede variar entre 2 y 4 minutos.

Productos

Agua destilada

Sulfato aluminico potásico o sulfato aluminico de amonio

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)

Yodato de sodio

Glicerol

Ácido acético glacial

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

12 Colorante hematoxilina de Gill

La hematoxilina de Gill es una buena tinción nuclear. Se puede emplear en tinciones generales junto con la eosina. Respecto a otras hematoxilinas es más estable y permite una reproducción de la tinción más precisa. Resalta su capacidad para teñir los nucléolos. Al no tener mercurio ni alcohol es buena como tinción de contraste de otras técnicas como la inmunocitoquímica.

Procedimiento

Agua destilada	750 ml
Etilenglicol	250 ml
Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)	2 g
Yodato de sodio	0.2 g
Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	20 ml

Preparación

La mezcla de los diferentes componentes ha de hacerse en este orden durante una hora aproximadamente. La solución colorante se puede usar inmediatamente

Tiene una vida útil más larga que otro tipo de hematoxilinas.

Las cantidades de hematoxilina, yodato de sodio y sulfato de aluminio se pueden incrementar para aumentar la fuerza de la tinción, guardando siempre las proporciones de estos tres elementos. Por ejemplo: 4 g, 0.4 g, 40 g, o 6 g, 0.6 g, 80 g, respectivamente. Los otros componentes se mantienen constantes en sus cantidades.

Cuando se usan concentraciones elevadas de hematoxilina, yodato de sodio y sulfato de aluminio se puede usar diluida 5 veces con agua destilada antes de usarla.

Productos

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)

Etilenglicol

Yodato sódico (NaIO₃)

Sulfato de aluminio (Al₂(SO₄)₃)

Ácido acético glacial

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Placa calefactora

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético de cristal oscuro

13 Colorante hematoxilina de Harris

La hematoxilina de Harris es una buena tinción nuclear, que se puede usar bien de forma regresiva y o bien de forma progresiva. Se emplea mucho en citologías para detectar células malignas. Contiene óxido de mercurio, aunque puede sustituirse por otra sustancia, el cual oxida la hematoxilina a hemateína, que es el verdadero colorante de la solución.

Procedimiento

- Variante con mercurio

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290) 5 g
Sulfato de amonio y aluminio 100 g
Óxido de mercurio (HgO)..... 2.5 g
Agua destilada hasta 1000 ml

- Variante sin mercurio

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290) 5 g
Etanol 100° 50 ml
Sulfato de amonio y aluminio 100 g
Yodato sódico 0.37 g
Agua destilada hasta 1000 ml

Preparación

1. Disolver la hematoxilina en el etanol (puede ser necesario añadir algo del agua destilada para su total disolución).
2. Disolver el sulfato de amonio y aluminio en agua caliente.
3. Mezclar las dos soluciones anteriores, y llevar la solución resultante a ebullición.
4. Quitar del calentador, enfriar y añadir el óxido de mercurio o el yodato sódico lentamente y con agitación suave.
5. Solución con yodato sódico: recalentar de nuevo y llevar la solución hasta ebullición
6. Enfriar colocando el vaso de precipitado con la

solución en agua helada.

7. Cuando esté fría filtrar la solución y guardar en un frasco oscuro (proteger de la luz).

La solución es estable durante varios meses. Para comprobar su estado, antes de usar, se echa una gota sobre un papel del filtro y debe aparecer un centro de color marrón con un borde de color púrpura. Si esto no ocurre hay que desechar la solución.

Productos

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)
Etanol 100°
Óxido de mercurio (HgO)
Yodato sódico (NaIO₃)
Sulfato de amonio y aluminio (AlNH₄(SO₄)₂)
Agua destilada

Material

Probeta
Balanza
Agitador magnético
Placa calefactora
Vasos de precipitado
Botellas con cierre hermético de cristal oscuro

14 Colorante hematoxilina de Mayer

La hematoxilina de Mayer es uno de los tipos de hematoxilina que se emplean normalmente en las tinciones de hematoxilina-eosina. Su modo de tinción es progresiva, es decir, cuanto más tiempo en la solución colorante más tinción se consigue en el tejido.

Procedimiento

Agua destilada	1000 ml
Sulfato alumínico potásico o sulfato alumínico de amonio	50 g
Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290) ..	1 g
Yodato de sodio	0.2 g
Ácido cítrico	1 g
Hidrato de cloral	50 g

Consejos

Añadir el sulfato hasta que esté completamente disuelto y posteriormente añadir la hematoxilina. Cuando la hematoxilina esté completamente disuelta se añade el ácido cítrico, el hidrato de cloral y yodato de sodio. Hervir durante 5 minutos, enfriar y filtrar. Puede ser usada de inmediato.

Productos

Agua destilada

Sulfato alumínico potásico o sulfato alumínico de amonio

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)

Yodato de sodio

Ácido cítrico

Hidrato de cloral

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético / placa térmica

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

15 Colorante hematoxilina de Weigert

Hematoxilina de Weigert o hematoxilina férrica; se utiliza para la tinción de núcleos cuando se usa a continuación una sustancia ácida. La hematoxilina se aplica junto con un mordiente que contiene aluminio potásico o aluminio amónico y por ello no se elimina en la solución ácida posterior. La hematoxilina y el mordiente se almacenan por separado y se aplican al tejido conjuntamente. El color resultante es negro o púrpura muy oscuro. Se emplea en soluciones tricrómicas como el van Gieson.

Procedimiento

- Solución A (Hematoxilina)

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290) ... 1 g
Etanol 96° 100 ml

- Solución B (Cloruro de hierro)

Cloruro de hierro (III) 1.16 g
Ácido clorhídrico (25%) 1 ml
Agua destilada 99 ml

Consejos

Los dos componentes se almacenan por separado y se unen cuando se va a realizar la tinción. Se añade 100 ml de la solución A a otros 100 ml de la solución B, y se mezcla la solución resultante. El tiempo de tinción depende de la técnica y tejido usado.

Tras la tinción con la solución de hematoxilina, y tras lavar en agua corriente abundantemente (30 min), se pueden incubar las secciones en hidrógeno carbonato de sodio (bicarbonato de sodio) al 01 % en agua destilada para que los núcleos adquieran un color azulado. El tiempo para conseguir el color deseado depende de la coloración que queramos conseguir, lo cual se puede controlar mediante la observación de las secciones al microscopio

Productos

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)

Cloruro de hierro (III)

Ácido clorídrico

Etanol 96°

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

16 Colorante picrofucsina de van Gieson

La picrofucsina de van Gieson se emplea en la técnica del tricrómico de van Gieson. Fundamentalmente tiñe fibras del tejido conectivo como el colágeno y las fibras reticulares.

Procedimiento

- Solución A

Fucsina ácida (C.I. 75290) 1 g

Agua destilada 100 ml

- Solución B

Ácido pícrico Solución saturada

Consejos

Las soluciones A y B se mezclan en una proporción 1:45. Esta solución de trabajo se puede usar en el momento o dejar madurar varias semanas. En cualquier caso, antes de usar se le puede añadir 0.25 ml de ácido clorhídrico.

Productos

Fucsina ácida (C.I. 75290)

Ácido clorhídrico

Solución saturada de ácido pícrico

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

17 Colorante reactivo de Schiff

Es un reactivo muy utilizado en la tinción de PAS-hematoxilina. Es un compuesto preparado a partir de fucsina básica (clorohidrato de pararosanilina), ácido clorhídrico y metabisulfito sódico o potásico. Se utiliza tradicionalmente para detectar polisacáridos, más concretamente grupos aldehídos que se crean en sus moléculas durante el proceso de tinción (ver el protocolo de la tinción de PAS-Hematoxilina). Hay varias maneras de preparar el reactivo de Schiff según se describe en el libro de Martoja y Martoja. "Initiations aux techniques de l'histologie animale". Pierson 1970 (Edición en español de 1970, Toray-Masson).

Procedimiento

- Método de Coleman

Agua hirviendo 200 ml

Fucsina básica (clorohidrato de pararosanilina) . 1 g

Dejar enfriar tras la disolución

Metabisulfito potásico 2 g

Ácido clorhídrico normal 10 ml

Al cabo de 24 h se añade

Carbón activo 0.5 g

Agitar vigorosamente durante 1 min, dejar sedimentar y filtrar.

- Método de Lillie

Fucsina básica 1 g

Metabisulfito sódico 1.9 g

Ácido clorhídrico 100 ml a 0,15 N

Dejar que la solución se decolore agitando de vez en cuando. Cuando haya una casi total decoloración (12 a 24 h) se continúa con la receta

Carbón activo 0,5 g

Agitar vigorosamente durante 1 min, dejar sedimentar y filtrar.

- Método de Graumann

Fucsina ácida 0.5 g

Metabisulfito potásico 0.5 g

Ácido clorhídrico 15 ml a 1 N

Agua destilada 85 ml

Mezclar las soluciones, dejar sedimentar durante 24 h. Cuando se alcance una decoloración casi total se sigue con la receta Carbón activo

Agitar vigorosamente durante 1 min, dejar sedimentar y filtrar

Consejos

Independientemente del método de preparación del reactivo de Schiff, la solución debe conservarse en la oscuridad en un frasco cerrado herméticamente. Es conveniente conservarlo en un frigorífico. Antes de cada uso comprobar que el reactivo desprende un olor sulfuroso. De lo contrario añadir 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y unos decigramos de metabisulfito.

Productos

Fucsina básica

Metabisulfito sódico

Metabisulfito potásico

Ácido clorhídrico

Carbón activo

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético / placa térmica

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

Papel de aluminio para mantenerlo en oscuridad

Nevera para su conservación

18 Colorante rojo neutro

El rojo neutro (C.I. 50040) o rojo de toluidina o rojo básico, se utiliza como colorante de contraste en tinciones generales. Se puede emplear como colorante vital puesto que las células animales lo incorporan en los lisosomas, los macrófagos además en sus gránulos, y las vegetales en las vacuolas. Tiñe núcleos y lisosomas de color rojo. Es uno de los colorantes más usados en experimentos de citotoxicidad puesto que sólo las células vivas lo incorporan, pero no aquellas que están muertas o muriendo. Por último, se utiliza como indicador de pH puesto que cambia de rojo a amarillo a pH entre 6.8 y 8.

Procedimiento

Rojo neutro (C.I. 50040) 0.5 g
Ácido acético glacial unas gotas
Agua destilada 100 ml

Consejos

El tiempo de tinción es de 1 a 5 minutos.

Productos

Rojo neutro (C.I. 50040)

Ácido acético glacial

Agua destilada

Material

Probeta

Balanza

Agitador magnético

Vasos de precipitado

Botellas con cierre hermético

19 Colorante safranina

La safranina es un colorante catiónico que aporta color rojo a las estructuras histológicas. Es muy usada en histología vegetal donde tiñe de rojo los núcleos y la lignina de las paredes celulares secundarias. También se usa en las tinciones Gram para bacterias.

Procedimiento

Safranina (C.I. 75100) 1 g
Etanol 95° 15.5 ml
Agua destilada 14.5 ml

Consejos

Antes de usar, mezclar la solución madre y etanol 50° (1:1)

Productos

Agua destilada
Safranina (C.I. 75100)
Etanol 95°
Etanol 50°

Material

Probeta
Balanza
Agitador magnético
Vasos de precipitado
Botellas con cierre hermético

20 Colorante verde luz / rápido

El verde luz (C.I. 42095) y el verde rápido (C.I. 42053) son dos colorantes muy solubles en agua que se usan en tinciones de tejido conectivo, normalmente como parte de tinciones tricrómicas en tejidos animales y también se usa para tejidos de plantas en combinación con la safranina. Se pueden usar indistintamente ya que aportan las mismas propiedades pero la coloración del verde rápido es más duradera en el tiempo.

Procedimiento

- Verde luz (para tricrómico de Masson)

Verde luz 2 g
 Ácido acético 2 ml
 Agua destilada hasta 98 ml

- Verde rápido (para tricrómico de Masson)

Verde rápido 0,2 g
 Agua destilada 100 ml

- Verde rápido (para tinción de tejido vegetal)

Verde rápido 1 g
 Etanol 100° 50 ml
 Esencia de clavo 50 ml

Productos

Agua destilada
 Verde luz (C.I. 42095)
 Verde rápido (C.I. 42053)
 Ácido acético
 Esencia de clavo

Material

Probeta
 Balanza
 Agitador magnético / placa térmica
 Vasos de precipitado
 Botellas con cierre hermético

21 Colorante violeta de cresilo

El violeta de cresilo acetato es un colorante sintético básico que se emplea para teñir sobre todo sistema nervioso, aunque también para mastocitos y gránulos del cartílago (no confundir el violeta de cresilo con el cristal violeta que se usa para tinciones Gram bacterianas). En el sistema nervioso, el violeta de cresilo se usa en conjunción con el luxol azul rápido (luxol fast blue), el cual tiñe lípidos concentrados en la mielina.

Procedimiento (a)

Violeta de cresilo 0,1 g
 Agua destilada 100 ml
 Ácido acético ... Unas dos gotas (unos 0,25 ml)

Procedimiento (b)

Ácido acético 0,6 ml en 100 ml de H₂O (A)
 Acetato sódico ... 1,36 mg en 100 ml de H₂O (B)
 Tampón acetato Solución A:B (9:1)
 Violeta de cresilo 1 g en 100 ml de H₂O
 Solución de trabajo: tampón acetato: violeta de cresilo 1:1

Consejos

En el procedimiento B, antes de mezclar el tampón acetato con la solución al 1 % de violeta de cresilo se ajusta el pH del tampón a 3.7.

Productos

Xileno
 Etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°
 Violeta de cresilo
 Ácido acético
 Acetato sódico
 H₂O destilada
 Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción
 Filtro de papel
 Probeta
 Botes
 Cesta para portas
 Cubreobjetos