

Protocolos do Laboratório de Fisiologia da Cognição



*Ricardo Gattass
Liliane Heringer Motta
Edil Saturato da Silva Filho*

Rio de Janeiro, RJ
2020

ÍNDICE

PROTÓCOLOS DE HISTOLOGIA: do LFC

Procedimentos Gerais:

- Soluções
- Diluição de Álcool

Soluções Tampão:

- Tampão fosfato
- Tampão fosfato – sucrose
- Tampão acetato
- Tampão Tris

Imunohistoquímica:

- Imunohistoquímica – Protocolo geral

Protocolos:

- BDA
- BDA e Toxina colérica
- CAT 301
- c-fos
- Mielina

Lectinas

- Vistiferia floribunda

Colorações histoquímicas:

- Acetil Colinesterase

- Celestine Blue (viabilidade celular)

- Celestine Blue – original
- Celestine Blue – para primatas

- Comentários sobre método para Celestine Blue

Citocromo c

Cresil

Gallyas

Heidenhein-Woelcke

NADPH-diaforase

Montagem

Perfusões para:

- Fluorescência
- Peroxidase
- Toxina Colérica

Pósfixação

Retina aplanada

Córtex aplanado

Caderno de Protocolo 1

Diluição do Álcool, a partir do álcool pring 99,3%:

50%	500 ml de álcool + 500 ml de água destilada = 1 litro
70%	700 ml de álcool + 300 ml de água destilada = 1 litro
75%	750 ml de álcool + 250 ml de água destilada = 1 litro
80%	800 ml de álcool + 200 ml de água destilada = 1 litro
85%	850 ml de álcool + 150 ml de água destilada = 1 litro
90%	900 ml de álcool + 100 ml de água destilada = 1 litro
95%	950 ml de álcool + 50 ml de água destilada = 1 litro

Montagem de cortes na lâmina, meio de montagem.

Celestine Blue em tampão fosfato 0,1 M

Citocromo Oxidase em tampão fosfato 0,1 M

Fluorescência em tampão fosfato 0,1 M

Gallyas em salina 0,9% diluída 1:1

Imuno Histoquímica em PBS 0,1 M

Nyssl em salina 0,9% diluída 1:1

Montagem das lâminas

Fluorescência

1° colocar as lâminas em álcool absoluto

2° xilol

3° montar com Entellan (bálsamo) e lâminula.

Citocromo Oxidase

Após 30 minutos em tampão formol 10% seguir a sequência:

Álcool 50% por 2 minutos

Álcool 75% por 2 minutos

Álcool 95% por 2 minutos

Álcool pring por 2 minutos

Álcool etílico absoluto por 2 minutos

Colocar no Xilol 1 por 1 minuto

E depois xilol 2 montar com lamínula por 3 minutos

Obs: acetil colinesterase (verde) e diaforase (roxinho) – mesma forma de montagem.

Cresil[®] Violeta 0,25% com ácido

Lâminas previamente inclusas no formol 10%.

Desidratar para desengordurar:

H₂O destilada – Lavar

Álcool 75% por 3 min.

Álcool 95% por 3 min.

Álcool pring por 3 min.

Clorofórmio + álcool pring por 10 min. iluído 1:1 (100ml de clorofórmio + 100 ml de pring)

Hidratar, pois o cresil é feito com H₂O

Álcool pring por 3 min.

Álcool 95% por 3 min.

Álcool 75% por 3 min.

H₂O destilada por 2 min.

Diferenciar

Cresil violeta 0,25% com ácido acético à 37° c por 1 min.

H₂O destilada – Lavar

Álcool 75% por 3 min.

Álcool 95% + ácido acético 10% (30 gotas) □ alguns mergulhos

Desidratar para levar para o xilol e depois colocar a lamínula com Entellan.

Álcool 95% por 2 min.

Álcool pring por 2 min.

Álcool absoluto por 2 min.

Álcool absoluto + butílico 1:1 por 2 min.

Xilol 1 por 3 min.

Xilol 2 por 5 min.

Obs: Se a cor não estiver boa pode voltar.

Coloração de fibras mielíticas pela prata.
Revelação física (Método de Gallyas).

Reagentes :

- 1-Ácido silicotungstico
- 2-H₂O destilada
- 3-Ácido acético glacial
- 4-Ácido acético anidrido (anidrido acético)
- 5-Piridina (C₅H₅N)
- 6-Álcool
- 7-Nitrato de prata (Ag NO₃)
- 8-Nitrato de amônia (NH₄ NO₃)
- 9-Ferricianeto de potássio (K₃ Fe (CN₆))
- 10-Sulfito de sódio anidro (Na SO₃)
- 11-Hidróxido de sódio (Na OH)
- 12-Carbonato de sódio anidro (Na₂ CO₃)

Cortar em congelação (5-40 micras), cérebros fixados em formol.

Montar em lâminas gelatinizadas.

Deixar secar por um período de 24 horas no mínimo.

Solução de estoque:

Solução A:

Dissolver 50 gramas de carbonato de sódio anidro (Na₂ CO₃) gran analítico, em um litro de água destilada.

Solução B:

1 litro de água destilada

1,9 gramas de nitrato de amônia ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) gran analítico.

2,0 gramas de nitrato de prata (Ag NO_3) gran anlítico

10,0 gramas de ácido silicotungstico ($\text{S10}_2 \cdot 12\text{NO}_3 \cdot 26 \text{H}_2\text{O}$) gran analítico.

Solução C:

1 litro de água destilada.

1,9 gramas de nitrato de amônia

2,0 gramas de nitrato de prata.

10,0 gramas de ácido silicotungstico

7,3 ml de formol à 35%, ou 6,1 ml de formol 40% (formaldeído concentrado), em 1 litro de água destilada, na ordem mencionada.

Estas soluções estoque podem ser guardadas durante muitos meses. Antes do uso elas são misturadas da seguinte maneira:

Temperatura 0°	Sol.A (ml)	Sol.B (ml)	Sol.C (ml)
15 à 17	10 ml	0 ml	10 ml
20 à 22	10 ml	3 ml	7 ml
25 à 27	10 ml	5 ml	5 ml
30 à 32	10 ml	7 ml	3 ml
35 à 37	10 ml	9 ml	1 ml

Adicionar primeiro a Solução **A**, depois a **B** e então a **C**, sob agitação contínua e vigorosa. Deve-se usar uma proveta separada para a solução **A** , mas pode se usar a mesma proveta para **B** e **C**. Se aparecer um precipitado branco, desprezar o revelador e preparar outro.

Reação:

1 água destilada 5 minutos

- 2 piridina+ anidrido acético 2:1 50 min
 - 3 álcool 50% 3 min
 - 4 álcool 25% 3 min
 - 5 ácido acético glacial 0,05% 3 min
 - 6 ácido acético 0,1% 3 min
 - 7 ácido acético 0,5% 10 min
 - 8 0,20 gramas de Ag NO₃ + 0,19 gramas de NH₄ NO₃ + 3 ml de NaOH 2,5% + 200 ml de H₂O destilada 60 min(1 hora) ou até o fundo ficar amarelado.
 - 9 ácido acético glacial 0,5% 10 min
 - 10 revelador físico soluções **A,B,C** de 3min à 5 min.
 - 11 ácido acético glacial 0,5% 1 min
 - 12 K₃ Fe(CN)₆ 0,4% 8 min
 - 13 NA₂ SO₃ 0,5% 2 min
 - 14 Ácido acético glacial 0,5% 1 min
 - 15 revelador Físico (Solução A,B e C) 5 min
 - 16 Ácido acético glacial 0,5% 1 min
 - 17 K₃ Fe (CN)₆
 - 18 Na SO₃
 - 19 Água destilada ,álcool 50%, álcool 75%, álcool 95%, álcool 100%, álcool absoluto, xilol I, xilol II 3 min em cada
 - 20 Montar com Entellan e lamínula.
- OBS: Do 14 ao 18 só repetir se necessário.
Se estiver OK, do 13 vai para o 19.

Coloração de fibras mielíticas

Método de Heidenhain-Woelke (cortes soltos)

- 1) água destilada 4 X 30 min (para retirar o formol)
- 2) sulfato férrico amoniacal 2,5% durante 3 horas no escuro (solução reutilizável).
- 3) água destilada tirar o excesso (rápido)
- 4) corante 2 horas
- 5) diferenciação:
Lavar 4 X 30 segundos em água destilada, álcool 70% 3 min, álcool 80% 3 min, álcool 70% 2 min, álcool 50% no tempo de montar na lâmina gelatinizada ou albuminizada.
- 6) deixar secar durante à noite e desidratar em álcoois 70%, 80%, 95%, 100% absoluto 3 minutos em cada e xilol I e II 3 minutos em cada, montar com Entellan e lamínula.

Reagente:

Lítio (LiCO_3)

300 ml de água destilada

2 cm de cristais de lítio no fundo

Hematoxilina 10%

100 gramas de hematoxilina

1000 ml de álcool absoluto 100%

Corante:

200 ml de água destilada

40 ml de hematoxilina

Carbonato de lítio (LiCO_3) = em torno de 10 ml

OBS: Primeiro faz-se o teste para saber qual a proporção de lítio que vai se utilizar no definitivo.

O teste é feito na proporção de menos 10X do definitivo, ou seja;

20 ml água destilada

4 ml de hematoxilina

x ml de lítio

O lítio é adicionado em quantidades que variam de 0,6 à 1,6 ml /
adições de 0,2 ml

Citocromo Oxidase.

A incubação pode ser feita vários dias após o corte.

Antes de começar a trabalhar com DAB, forar toda a bancada com papel, usar luvas e depois de terminado o trabalho, deve-se limpar a bancada e demais utensílios com água sanitária pois o DAB e o cobalto são cancerígenos.

Para cada cuba de vidro:

250 ml de tampão fosfato 0,1M

1,2 ml de DMSO

6,0 ml de cloreto de cobalto 1%.

Deixar durante 15 minutos.

Lavar 3 vezes em TPO₄ 0,1M durante 5 minutos.

Incubar à 40° C no banho-maria.

Para cada cuba:

250 ml TPO₄ 0,1M

0,6 ml de DMSO

10 miligramas de catalase

25 miligramas de Citocromo C.

125 miligramas de DAB.

OBS: 40°C, borbulhar com O₂. Colocar as caixinhas após atingir a temperatura e saturar com O₂.

Cuidado com o precipitado: checar a formação de grãos no meio da incubação, após cerca de 3 horas.

Resultado:

Regiões marrom escuro(blobs, bandas).

Regiões alaranjadas (outras partes do córtex)

Regiões amarelo claro(substância branca)

Lavar 2 vezes em TPO_4 0.1M e depois manter durante 30 minutos em formol tamponado 10 %.

Desidratar, desengordurar, cobrir com Entellan.

OBS: A vidraria deverá ser lavada cuidadosamente com sulfocrômica antes do uso e após o uso deverá inativar o DAB com água sanitária.

Celestine Blue (criostato)

Cortes na lâmina e secos.

- 1) Fixador : etanol/formol 1 minuto
- 2) Lavar bastante com água destilada.
- 3) Iron sulfato de amônia 5 minutos
- 4) Lavar em água destilada
- 5) Celestine Blue 20 segundos a 10 minutos
- 6) Lavar em água corrente.
- 7) Hematoxilina de Mayer 5-10 minutos.
- 8) Lavar em água corrente 5-30 minutos
- 9) Formol 20% 2 minutos
- 10) Lavar em água destilada
- 11) Fucsina Ácida 1% 1 minuto
- 12) Ácido Acético glacial 1% 1 minuto
- 13) Lavar em água corrente (fica vermelho claro)
- 14) Água destilada
- 15) Desidratar nos álcoois e xilol
- 16) Entellan e cobrir com lamínula.

Soluções:

A) 31,2 gramas de $\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 1000 ml de água destilada.

B) 71,2 gramas de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 2000 ml de água destilada

ou 159,23 gramas de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 2000 ml de água destilada.

Para perfusão:

Formaldeído tamponado 4%

300 ml da solução A

2000 ml da solução B
500 ml formaldeído concentrado
2200 ml de água destilada

Fixador
Formol Concentrado 10 ml
Etanol 95% 90 ml

Iron sulfato de amônia à 4% em água destilada
4gramas para 100 ml
12 gramas para 300 ml

Fucsina ácida à 1% em água destilada
1grama para 100 ml
3gramas para 300 ml

Hematoxilina de Mayer

Cristais de hematoxilina 1,0 grama
Água destilada 1000 ml
Iodato de sódio 0,2 gramas
Ammonium ou potassium alumínium 50,0 gramas
Ácido cítrico 1,0 ml
Hidrato de cloral 50,0 gramas

Corante Celestine Blue

10 gramas de sulfato de ferro e amônia
250 ml de água destilada
0,5 ml de ácido cítrico

Diluir o sulfato de ferro e amônia na água destilada e colocar para esquentar, daí colocar o ácido clorídrico, quando as bolhas começarem a subir, colocar imediatamente o Celestine Blue. Desligar o calor imediatamente. Depois que a solução estiver fria, filtrar o corante.

Celestine Blue- Fucsina Ácida

(Protocolo da Fisiologia da Cognição)

- Cortes montados em Tampão fosfato (0,005M)

Fixação: Formalina 4% tamponada, cortes de 5µ em parafina.

PARA RETIRAR A PARAFINA.

- 1) Xyleno 2x3 min
- 2) Álcool absoluto 2x2 min
- 3) Álcool 95% 2 min
- 4) Álcool 70% 2 min
- 5) Água destilada 3 min
- 6) Celestine Blue 20 segundos até 10 minutos

COMEÇAR AQUI, QUANDO OS CORTES NÃO FOREM PARAFINADOS.

- 7) Lavar cuidadosamente em água corrente
- 8) Água destilada 2 min
- 9) Fucsina ácida 1% 1 min
- 10) Ácido acético glacial 1% 2-3 min
- 11) Lavar cuidadosamente em água corrente até o corante vermelho tornar-se vermelho claro.
- 12) Água destilada rapidamente.
- 13) Álcool 95% rapidamente
- 14) Álcool absoluto rapidamente
- 15) Xyleno 2x3 min
- 17) Montar as lâminas.

Soluções:

Ácido acético glacial 1%

Ácido acético glacial	2,5 ml
Água destilada	250 ml

Fucsina Ácida 1%

Fucsina ácida	2,5 gramas
Água destilada	250 ml

Celestine Blue

Sulfato férrico de amônia 5 gramas
Água destilada 250 ml
HCL (Ácido clorídrico) 0,5 ml

Aquecer a solução e quando a mesma estiver para ferver, acrescentar:

Celestine Blue 1,5 gramas e filtrar quando estiver frio.

OBS1: Não usar placa quente e sim bico de Bunsen.

OBS2: Usar um bastão de vidro para misturar.

OBS3: Utilizar ácido cítrico para limpar vidrarias manchadas pelo Celestine Blue.(1 grama para 100 ml de água destilada = 1%

Observações:

Devido a problemas com esta coloração aqui no Brasil, alguns passos da mesma foram modificados. O principal foi o equilíbrio entre o tom de azul e vermelho.

O background dessa coloração deve ser rosa claro, os neurônios viáveis devem mostrar-se marcadamente azulados e os neurônios inviáveis devem mostrar-se vermelho vivo.

Para tal resultado foi diminuído em 50% a concentração da fucsina ácida, bem como a concentração do ácido acético glacial. O tempo de exposição a esses corantes também foi significativamente reduzido (apenas um segundo em cada um).Em compensação, aumentou-se o tempo de lavagem na água e, principalmente, o tempo de exposição ao álcool.

Caderno de Protocolo 2

Tampões:

Tampão Fosfato 0,2 M (PH 7,2 - 7,4).

Preparo para 5 litros,

Solução A

dissolver 27,6 gramas de fosfato de sódio monobásico ($\text{Na H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 1 litro de água destilada.

Solução B

Dissolver 214,5 gramas de fosfato dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em 4 litros de H_2O destilada.

Para um litro 53,625 gramas,

Para dois litros 107,25 gramas.

OBS:

1) Se for $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, diluir 286,57 gramas em 4 litros de H_2O .

2) Se for Na_2HPO_4 usar 113,32 gramas para 4 litros de H_2O .

Misturar 1 parte de **A** para 4 de **B**, para obter a solução de tampão fosfato 0,2 M Ph 7,2 - 7,4.

Para obter tampão fosfato 0,1M, diluir a solução 0,2M com a mesma quantidade de H_2O .

Exemplo: Para um litro de H_2PO_4 0,1M,

100 ml de **A** + 400 ml de **B** + 500 ml de H_2O destilada = 1 litro de H_2PO_4 0,1M.

Tampão Acetato

Solução A :11,5 ml de ácido acético para 1 litro de H_2O destilada (0,2M)

Solução B: 13,6 gramas de acetato de sódio para 1.200 ml de H_2O destilada. (0,2M)

PH 3,3:

usar 500 ml de A + 30 ml de B= tampão acetato 0,2M (PH 3,3).

PH 6,0:

Solução A: 1litro (11,55ml de ácido acético e completar para o volume total de 1.000ml)

Solução B : (1 litro 16,4 gramas de acetato de sódio e completar para 1.000ml).

Para 100 ml = 2,1 sol.**A** + 47,9 sol.**B** + 50 ml de H₂O destilada

Para 1.000 ml= 42ml **A** + 958 ml de **B** + 1000ml de H₂O destilada

PH 8,2: 0,1M

Acetato de sódio 12,114 gramas

Água destilada 800ml

HCl concentrado colocar aos poucos (gotas) até obter PH 8,2, completar com H₂O destilada até 1.000 ml.

Tampão Tris:

Volume Molar 121,14

1M-----121,14

0,05M-----X

121,14

X0,5

60,570 gramas para 1 litro

1000ml-----60,57

100ml----X

1000X= 121,14

X= 1,21gramas para 100ml de água destilada.

PH fica em torno de 10,23 baixar para 7,4

Tris é básico, baixar com HCl (ácido clorídrico 100%)

Tampão Fosfato 0,1 M com sacarose

10%

100 gramas de sacarose para litro de tampão
10 gramas de sacarose para 100 ml de tampão

20 %

200 gramas de sacrose para 1 litro de tampão
20 gramas de sacarose para 100 ml de tampão

30%

1 litro de tampão fosfato 0,1 M
300 gramas de sucrose (sacarose), colocar no misturador até dissolver.

Tampão fosfato 0,1 M com azida

1 ml de azida - 10 ml de tampão = 1%

1 ml de azida - 100 ml de tampão = 0,1 %

1 ml de azida - 1000 ml de tampão = 0,01%

10 ml azida-1 litro de tampão fosfato (0,1M) = 0,1%

Agar solução 1%

1 grama de agar para 100 ml de salina 0,9%, aquecer e misturar até dissolver.

Solução de Carnoy

Clorofórmio 3 ml

Álcool absoluto 6 ml

Ácido acético cristalizado 1 ml = volume de 10 ml.

Solução de Colonnier

20 ml de Dicromato de potássio 5%

20 ml de água destilada

10 ml de glutaraldeído 25% = volume de 50 ml

Solução de Cloralose (anestésico)

1 grama de cloralose em 100 ml de água destilada, aquecer a água e colocar a cloralose não deixar passar de 70°C, filtrar.

Cresil Violeta 0,25%

260 ml de água destilada (aquecer à 37°C)

650 miligramas de cresil violeta em pó, agitar, filtrar e colocar 5 ml de ácido acético 10%.

FAM

Ácido acético glacial 1,0 ml

Formaldeído comercial 1,0 ml

Metanol 8,0 ml = volume de 10 ml

Formalina 10%

Para 100 ml

25 ml de formaldeído 37% ou 40%

75 ml de água destilada

Formalina

Para 1 litro

250 ml de formaldeído 37% ou 40%

750 ml de água destilada

Hidróxido de sódio 2,5%

Dissolver 2,5 gramas de hidróxido de sódio em 100 ml de água destilada.

Hidróxido de Sódio 4%

Dissolver 4 gramas de Hidróxido de sódio em 100 ml de água destilada.

PBS(0,1M)

Para cada litro de tampão fosfato 0,1 M adicionar 8,7 gramas de cloreto de sódio (NaCl).

PBSb (0,01M)

100 ml de PBS + 900ml de água destilada = 1000ml de PBSb

Salina 0,9%

9 gramas de Cloreto de sódio (Na CL) em 1 litro de água destilada

Sucrose Formol

725 ml de água destilada
300 gramas de sucrose (sacarose)
100 ml de formaldeído 37% ou 40%.

Vermelho Neutro

Dissolver 2 gramas de vermelho neutro em 200 ml de água destilada, filtrar e colocar 8 ml de de tampão acetato Ph 4,8.

Perfusão para toxina colérica.

Salina 0,9 % 4 litros
Paraformaldeído 4% em PBS 1litro
Paraformaldeído 4% em PBS com Sucrose 10% 1 litro
Sucrose 30% em PBS 1 litro

Paraformaldeído 4%

200gramas para 5 litros correção do para 210 gramas.
40 gramas para 1 litro
80 gramas para 2 litros

Sucrose (Sacarose) 10 %

100 gramas para 1 litro

Sucrose 30 %

300 gramas para 1 litro

Perfusão para Fluorescência

Salina 0,9 % - 3 litros
Paraformaldeído 4% em PBS - 3 litros
Paraformaldeído 4% em PBS e glicerol 2,5% - 2litros

PBS + glicerol 5% - 2 litros
PBS + glicerol 10% - 1 litros

OBS:

Para cada litro de Tampão Fosfato 0,1 M; adicionar 8,7 gramas de cloreto de sódio. (NaCl).

PBS + glicerol 5% : 50 ml de glicerol para 950 ml de PBS = 1 litro

100 ml de glicerol para 1900 ml de PBS = 2 litros

PBS + glicerol 10% : 100 ml glicerol para 900 ml = 1000 ml

Para fazer 5 litros (5000 ml) de paraformaldeído (pó) 4% : 210 gramas de paraformaldeído dissolver em 5 litros de PBS, tirar 3 litros (pronto para uso).

Os 2 litros restantes acrescentar o glicerol 2,5% : 1950 ml de paraformaldeído 4% + 50 ml de glicerol.

OBS: Ouve uma correção no paraformaldeído, em vez de 200 gramas usamos 210 gramas;

Fazer a dissolução na capela pois o cheiro é muito forte.

Deve-se aquecer o PBS antes de colocar o paraformaldeído à 50-60° , e manter agitando até diluir, colocar algumas gotas de NaOH 2,5% até ficar limpo.

Perfusão para Peroxidase:

Fixação 4 litros

200 ml glutaraldeído 25 %

40 gramas paraformaldeído

tampão fosfato 4.000ml (3.760ml)

diluição paraformaldeído 40 gramas dilui em 500 ml de água destilada na temperatura de 70°C, clarificar com Na OH (2,5%).

Tampão fosfato com sucrose 10%.

2000 ml TPO₄ + 200 gramas sucrose

Fixação retina/cérebro.

Paraformaldeído 4% em PBS (durante 10 dias).
Trocar para paraformaldeído 4% em PBS + Sucrose 10%
(durante 3 dias).
E então trocar para TPO₄ + Sucrose 30%.

Triton X-100
0,5% em PBS
0,5 ml 100 ml;

SOLUÇÕES

SOLUÇÕES USUAIS:

Solução de Carnoy

Clorofórmio 3 ml

Álcool absoluto 6 ml

Ácido acético cristalizado 1 ml = volume de 10 ml.

Solução de Colonier

20 ml de Dicromato de potássio 5%

20 ml de água destilada

10 ml de glutaraldeído 25% = volume de 50 ml

Solução de Cloralose (anestésico)

1 grama de cloralose em 100 ml de água destilada, aquecer a água e colocar a cloralose não deixar passar de 70°C, filtrar.

Cresil Violeta 0,25%

260 ml de água destilada (aquecer à 37°C)

650 miligramas de cresil violeta em pó, agitar, filtrar e colocar 5 ml de ácido acético 10%.

FAM

Ácido acético glacial 1,0 ml

Formaldeído comercial 1,0 ml

Metanol 8,0 ml = volume de 10 ml

Formalina 10%

Para 100 ml

25 ml de formaldeído 37% ou 40%

75 ml de água destilada

Formalina

Para 1 litro

250 ml de formaldeído 37% ou 40%

750 ml de água destilada

Hidróxido de sódio 2,5%

Dissolver 2,5 gramas de hidróxido de sódio em 100 ml de água destilada.

Hidróxido de Sódio 4%

Dissolver 4 gramas de Hidróxido de sódio em 100 ml de água destilada.

PBS(0,1M)

Para cada litro de tampão fosfato 0,1 M adicionar 8,7 gramas de cloreto de sódio (NaCl).

PBSb (0,01M)

100 ml de PBS + 900ml de água destilada = 1000ml de PBSb

Salina 0,9%

9 gramas de Cloreto de sódio (Na CL) em 1 litro de água destilada

Sucrose Formol

725 ml de água destilada

300 gramas de sucrose (sacarose)

100 ml de formaldeído 37% ou 40%.

Vermelho Neutro

Dissolver 2 gramas de vermelho neutro em 200 ml de água destilada, filtrar e colocar 8 ml de de tampão acetato Ph 4,8.

Triton X-100

0,5% em PBS

0,5 ml 100 ml;

Métodos

Montagem de cortes na lâmina.

Celestine Blue em tampão fosfato 0,1 M
Citocromo Oxidase em tampão fosfato 0,1 M
Fluorescência em tampão fosfato 0,1 M
Gallyas em salina 0,9% diluída 1:1
Imuno-histoquímica em PBS 0,1 M
Nyssl em salina 0,9% diluída 1:1

Meios de Montagem

Colorações – Entellan
Fluorescentes – Fluoromount

RETINA APLANADA

1) Animal - Perfusão com paraformaldeído.

- remover o globo ocular
- Seccionar em duas metades na zona equatorial
- imersão em solução:
 - Tampão fosfato 0,075 M (Ph 7,2 - 7,4).
 - Paraformaldeído 4% por 10 min..
- Aplanamento e remoção do humor vítreo.
- Fixado entre duas folhas de papel de filtro 50.
- Imersão em mesma solução por uma hora.

2) Perfusão sem paraformaldeído.

- fixar por tempo maior

ALCOOLS

Concentração 50 g/l

REAGENTES:

PREPARO:

Adicione

TAMPÃO FOSFATO 0,2 M (PH 7,2 - 7,4).

Preparo para 5 litros,

Solução A

dissolver 27,6 gramas de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 1 litro de água destilada.

Solução B

Dissolver 214,5 gramas de fosfato dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em 4 litros de H_2O destilada.

Para um litro 53,625 gramas,

Para dois litros 107,25 gramas.

OBS:

1) Se for $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, diluir 286,57 gramas em 4 litros de H_2O .

2) Se for Na_2HPO_4 usar 113,32 gramas para 4 litros de H_2O .

Misturar 1 parte de A para 4 de B, para obter a solução de tampão fosfato 0,2 M Ph 7,2 - 7,4.

Para obter tampão fosfato 0,1M, diluir a solução 0,2M com a mesma quantidade de H_2O .

Exemplo: Para um litro de H_2PO_4 0,1M,

100 ml de A + 400 ml de B + 500 ml de H_2O destilada = 1 litro de H_2PO_4 0,1M.

TAMPÃO FOSFATO 0.1 M COM SUCROSE (ou SACAROSE)

10%

100 gramas de sacarose para litro de tampão

10 gramas de sacarose para 100 ml de tampão

20 %

200 gramas de sacrose para 1 litro de tampão

20 gramas de sacarose para 100 ml de tampão

30%

1 litro de tampão fosfato 0,1 M

300 gramas de sucrose (sacarose), colocar no misturador até dissolver.

TAMPÃO ACETATO

Solução A :11,5 ml de ácido acético para 1 litro de H₂O destilada (0,2M)

Solução B: 13,6 gramas de acetato de sódio para 1.200 ml de H₂O destilada. (0,2M)

PH 3,3:

usar 500 ml de A + 30 ml de B= tampão acetato 0,2M (PH 3,3).

PH 6,0:

Solução A: 1litro (11,55ml de ácido acético e completar para o volume total de 1.000ml)

Solução B : (1 litro 16,4 gramas de acetato de sódio e completar para 1.000ml).

Para 100 ml = 2,1 sol.A + 47,9 sol.B + 50 ml de H₂O destilada

Para 1.000 ml= 42ml A + 958 ml de B + 1000ml de H₂O destilada

PH 8,2: 0,1M

Acetato de sódio 12,114 gramas

Água destilada 800ml

HCl concentrado colocar aos poucos (gotas) até obter PH 8,2, completar com H₂O destilada até 1.000 ml.

TAMPÃO TRIS

Tampão Tris (Ph 10,2):

Volume Molar 121,14

1M-----121,14

0,05M-----X

121,14

X0,5

60,570 gramas para 1 litro

1000ml-----60,57

100ml-----X

1000X= 121,14

X= 1,21gramas para 100ml de água destilada.

PH fica em torno de 10,23 baixar para 7,4

Tris é básico, baixar com HCl (ácido clorídrico 100%)

Montagem das Lâminas

Fluorescência

colocar as lâminas em álcool absoluto

xilol

montar com Entellan (bálsamo) e lâminula.

*Citocromo Oxidase (marron), acetil colinesterase (verde)
e diaforase (roxinho):*

Após 30 minutos em tampão formol 10% seguir a sequência:

Álcool 50% por 2 minutos

Álcool 75% por 2 minutos

Álcool 95% por 2 minutos

Álcool pring por 2 minutos

Álcool etílico absoluto por 2 minutos

Coloca-se no xilol 1 por 1 minuto

Depois do xilol por 3 minutos e montar com lamínula

COLORAÇÕES

ALCOOL 50
Concentração 50 g/l

Adicione

MÉTODOS DE NISSL

Cresil Violeta 0,25% com ácido

As lâminas são previamente imersas em formol 10%.

Desidratar para desengordurar:

Etapas:

H₂O destilada por Lavar

Álcool 75% por 3 min.

Álcool 95% por 3 min.

Álcool pring por 3 min.

Clorofórmio + álcool pring por 10 min. diluído 1:1 (100ml de clorofórmio + 100 ml de pring)

Hidratar, pois o cresil é feito com H₂O

Álcool pring por 3 min.

Álcool 95% por 3 min.

Álcool 75% por 3 min.

H₂O destilada por 2 min.

Diferenciar

Cresil violeta 0,25% com ácido acético à 37° c por 1 min.

H₂O destilada □ Lavar

Álcool 75% por 3 min.

Álcool 95% + ácido acético 10% (30 gotas) por alguns mergulhos

Desidratar para levar para o xilol e depois colocar a lâmina com Entellan.

Álcool 95% por 2 min.

Álcool pring por 2 min.

Álcool absoluto por 2 min.

Álcool absoluto + butílico 1:1 por 2 min.

Xilol ₁ por 3 min.

Xilol ₂ por 5 min.

Obs: Se a cor não estiver boa pode voltar.

VERMELHO NEUTRO

Adicione

HEMATOXILINA EOSINA

IMUNOHISTOQUÍMICA

Para reagir 15 cortes:

Prepare 3 litros de PBSB

30ml de Diluente (15 para adicionar ao anticorpo -

Etapa 3;

15 para Etapa 6)

ETAPAS

- 1 Armazenamento dos cortes
- 2 Lavagem PBSB 10 min
10 min
60 min
- 3 Anticorpo primário durante a noite: de 24 a 72 horas a 5 *C
- 4 Lavagem PBSB 10 min
10 min
10 min
- 5 Anticorpo secundário 1 hora a 24*C
- 6 Lavagem PBSB 10 min
10 min
10 min
- 7 Preparo de C (A+B*C) 20 min
- 8 Incubar sessões em C 1 hora
- 9 Lavagem PBSB 10 min
10 min
10 min
- 10 DAB 2.5 a 3 min (máximo 5 min)
- 11 Montagem do corte em PBSB

- 12 Desidratar os cortes em série de álcools
- 13 Diafanizar em Xilol
- 14 Cobrir com lamínulas com DPX
(Para anticorpo fluorescente montar com
fluormount ou
vectorshield)

ETAPAS DETALHADAS - PREPARO DE SOLUÇÕES

PRELIMINARES:

Fixação do cérebro com paraformaldeído 4%.

Cortes em congelação a 40 *m

ETAPA 1 ARMAZENAMENTO DOS CORTES em:

PBS+Sodium Mesite.1%
glicol
(na geladeira)

PBS+glicerol+etileno
glicol
(no freezer)

*

*

ETAPA 2 LAVAGEM EM PBSB

10 min
10 min
60 min

10x 10min
ou
9x 10min+
1x 60min

Antes da etapa 3 preparar o diluente a ser empregado nas Etapas 3 e 7

Preparo do diluente:

BSA 0.05% + Triton X 0.3% em PBSB

Para reagir 15seções preparar 30ml (15ml - etapa 3 + 15ml - etapa 7)

15mg de BSA cristalino (Sigma A-3059) + 90* μ l Triton-X em 30ml de PBSB

Diluições ótimas dos diferentes anticorpos para reagir cortes de cérebro de macaco:

	CAT-301	1:2 a 1:10
SMI32	1:5000	
	GAP-43	1:1000
PA	1:3000	
	CB	1:2500
	CR	1:3000

ETAPA 3 ANTICORPO PRIMÁRIO
(Manter alíquotas de 25* μ l a -80 oC)

1ml/seção 5oC - mínimo 12 horas (overnight) c/
agitação
(48 h para CAT-301; 72 h para GAP-43)

Exemplo de cálculo da quantidade de anticorpo SMI32:
diluição ótima 1:5000

Para reagir 15 seções - preparar 15ml
 $15/5000=0.003\text{ml}=3 \text{ *}\mu\text{l}$ de SMI32
15ml de diluente + 3* μ l de SMI32

ETAPA 4 LAVAGEM EM PBSB
3 x 10 min

ETAPA 5 ANTICORPO SECUNDÁRIO

20ml PBSB
6 gotas (300* μ l) de soro
2 gotas (100* μ l) anticorpo secundário
1hora temperatura ambiente

Anticorpo primário	Soro	Anticorpo secundário
SMI32		
CB		
PA		
Horse	Anti-mouse biotilado	

Kit Vector PK4002
1:200

CR
Goat Anti-rabbit biotilado
Kit Vector PK4001
1:200

ETAPA 6 LAVAGEM EM PBSB
3 x 10 min

ETAPA7 PREPARO DE C (A+B*C)
(Kit A-B-C Standard da Vector)

15ml Diluente + 3 gotas de A - misturar lentamente
Adicionar 3 gotas de B e agitar rapidamente
Deixar C em repouso 20 min antes de usar

ETAPA 8 INCUBAR EM C
1hora

ETAPA 9 LAVAGEM EM PBSB
3 x 10 min

ETAPA 10 REAÇÃO COM DAB 0,05%
(Para 15 seções - 50 ml)

Observação: Esta etapa é feita nas placas com buracos maiores,
empregando 3ml/seção

5ml DAB estoque + 45ml PBSB + 50* μ l H₂O₂ 3%
2.5 a 3 min - máximo de 5min
(Parar a reação quando a lâmina estiver bem corada).

Preparo da solução de DAB para estoque:
Dissolver 500 mg DAB em 95 ml dH₂O
Acrescentar 5ml tampão PO₄ 2M + 9g NaCl
Volume total = 100 ml.

Guardar 5 ml em cada tubo Falcon de 50 ml.
Estocar a -200C.

- ETAPA 11 MONTAR OS CORTES EM PBSB
- ETAPA 12 DESIDRATAR EM SÉRIE DE ÁLCOOLS
- | | |
|--------------|-------|
| 75% | 15seg |
| 90% | 15seg |
| 100% (Pring) | 15seg |
| Absoluto | 15seg |
- ETAPA 13 DIAFANIZAR EM XILOL
- | | |
|-------|--------------------|
| Xilol | 1min |
| Xilol | 3min ou até montar |
- ETAPA 14 MONTAR A LAMÍNULA COM DPX
- Para anticorpo fluorescente empregar
fluormount ou
vectorshield.

No caso de Anticorpo secundário com fluorescencia, por exemplo Cy3 pode-se fazer uma coloração nuclear com DAPI.

Neste caso:

- ETAPA 10 Corar com solução de DAPI por 1 minuto.
- ETAPA 11 Lavar com PBS.
- ETAPA 14 Montar a lamínula com Vectorshield.

MÉTODOS DE GALLIAS

Coloração de fibras mielóticas pela prata.

Revelação física (Método de Gallias).

REAGENTES:

- 1-Ácido silicotungstico
- 2-H₂O destilada
- 3-Ácido acético glacial
- 4-Ácido acético anidrido (anidrido áctico)
- 5-Piridina (C₅H₅N)
- 6-Álcool
- 7-Nitrato de prata (Ag NO₃)
- 8-Nitrato de amônia (NH₄ NO₃)
- 9-Ferricianeto de potássio (K₃ Fe (CN₆))
- 10-Sulfito de sódio anidro (Na SO₃)
- 11-Hidróxido de sódio (Na OH)
- 12-Carbonato de sódio anidro (Na₂ CO₃)

PREPARO:

Cérebros fixados em formol cortar em congelação (5-40μ).

Montar em lâminas gelatinizadas.

Deixar secar por um período de 24 horas no mínimo.

Solução de estoque:

Solução A:

Dissolver 50 gramas de carbonato de sódio anidro (Na₂ CO₃) gran analítico, em um litro de água destilada.

Solução B:

1 litro de água destilada

1,9 gramas de nitrato de amônia (NH₄ NO₃) gran analítico.

2,0 gramas de nitrato de prata (Ag NO₃) gran anlítico

10,0 gramas de ácido silicotungstico (S₁₀O₂ .12NO₃.26 H₂O) gran analítico.

Solução C:

1 litro de água destilada.

1,9 gramas de nitrato de amônia

2,0 gramas de nitrato de prata.

10,0 gramas de ácido silicotungstico

7,3 ml de formol à 35%, ou 6,1 ml de formol 40% (formaldeído concentrado), em 1 litro de água destilada, na ordem mencionada.

Estas soluções estoque podem ser guardadas durante muitos meses. Antes do uso elas são misturadas da seguinte maneira:

Temperatura 0°	Sol.A	Sol.B	Sol.C
15 à 17	10 ml	0 ml	10 ml
20 à 22	10 ml	3 ml	7 ml
25 à 27	10 ml	5 ml	5 ml
30 à 32	10 ml	7 ml	3 ml
35 à 37	10 ml	9 ml	1 ml

Adicionar primeiro a Solução **A**, depois a **B** e então a **C**, sob agitação contínua e vigorosa. Deve-se usar uma proveta separada para a solução **A**, mas pode se usar a mesma proveta para **B** e **C**. Se aparecer um precipitado branco, desprezar o revelador e preparar outro.

Reação:

- 1 água destilada 5 minutos
- 2 piridina+ anidrido acético 2:1 50 min
- 3 álcool 50% 3 min
- 4 álcool 25% 3 min

- 5 ácido acético glacial 0,05% 3 min
 - 6 ácido acético 0,1% 3 min
 - 7 ácido acético 0,5% 10 min
 - 8 0,20 gramas de Ag NO_3 + 0,19 gramas de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ + 3 ml de NaOH 2,5% + 200 ml de H_2O destilada 60 min(1 hora) ou até o fundo ficar amarelado.
 - 9 ácido acético glacial 0,5% 10 min
 - 10 revelador físico soluções **A,B,C** de 3min à 5 min.
 - 11 ácido acético glacial 0,5% 1 min
 - 12 $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,4% 8 min
 - 13 $\text{Na}_2 \text{SO}_3$ 0,5% 2 min
 - 14 Ácido acético glacial 0,5% 1 min
 - 15 revelador Físico (Solução A,B e C) 5 min
 - 16 Ácido acético glacial 0,5% 1 min
 - 17 $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$
 - 18 $\text{Na}_2 \text{SO}_3$
 - 19 Água destilada ,álcool 50%, álcool 75%, álcool 95%, álcool 100%, álcool absoluto, xilol I, xilol II 3 min em cada
 - 21 Montar com Entellan e lamínula.
- OBS: Do 14 ao 18 só repetir se necessário.
Se estiver OK, do 13 vai para o 19.

MÉTODO DE HEIDENHEIN-WOELKE I

(Para uma solução de 250 ml)

1 – Lavar os cortes, no mesmo dia, em H₂O destilada para retirar o formol. Lavar 3 vezes (1 hora cada lavagem) ou deixar overnight.

2 – Colocar os cortes no Sulfato Férrico Amoniacal 2,5% por 3 horas e no escuro.

22,5 g de FeNH₄(SO₄)₂
950 ml de H₂O destilada
(reutilizável)

3 – Retirar o excesso de Sulfato Férrico lavando em H₂O destilada (3 vezes)

4 – Deixar por 2 horas na seguinte solução:
200 ml de H₂O destilada
40 ml de Hematoxilina (envelhecida) *
6,0 ml de LiCO₃**

5 – Lavar os cortes em H₂O destilada (3 vezes)

6 – Passar pelos Álcools:
70%
80%
70%
50% (3 min em cada um)

7 – Montar os cortes em Álcool 50%

* Hematoxilina envelhecida (100g de Hematoxilina + 1000 ml de álcool absoluto)

** Teste para determinar a concentração de Lítio adequada:

- Lavar os cortes
- Colocá-los no Sulfato Férrico Amoniacal
- Lavá-los de novo
- Prepar uma solução de Hematoxilina + H₂O destilada e distribuí-la igualmente nos compartimentos de uma cuba

de gelo. Para cada um deles colocar uma quantidade diferente de LiCO_3 diferente que varie em torno de 1 ml. Deixar por 2 horas.

- Lavar os cortes outra vez
- Passar pelos Álcoois
- Montá-los e escolher a melhor concentração.

MÉTODOS DE HEIDENHEIN-WOELKE II

(com cortes soltos)

- 1) água destilada 4 X 30 min (para retirar o formol)
- 2) sulfato férrico amoniacal 2,5% durante 3 horas no escuro (solução reutilizável).
- 3) água destilada tirar o excesso (rápido)
- 4) corante 2 horas
- 5) diferenciação:
Lavar 4 X 30 segundos em água destilada, álcool 70% 3 min, álcool 80% 3 min, álcool 70% 2 min, álcool 50% no tempo de montar na lâmina gelatinizada ou albuminizada.
- 6) deixar secar durante à noite e desidratar em álcoois 70%, 80%, 95%, 100% absoluto 3 minutos em cada e xilol I e II 3 minutos em cada, montar com Entellan e lamínula.

Reagente:

Lítio (LiCO_3)

300 ml de água destilada

2 cm de cristais de lítio no fundo

Hematoxilina 10%

100 gramas de hematoxilina

1000 ml de álcool absoluto 100%

Corante:

200 ml de água destilada

40 ml de hematoxilina

carbonato de lítio (LiCO_3) = em torno de 10 ml

OBS: Primeiro faz-se o teste para saber qual a proporção de lítio que vai se utilizar no definitivo.

O teste é feito na proporção de menos 10X do definitivo, ou seja;

20 ml água destilada

4 ml de hematoxilina

X ml lítio

O lítio é variado (X ml de solução saturada) geralmente de 0,6 à 1,6 ml / em degraus de 0,2 ml.

MÉTODO DE HEIDENHEIN-WOELKE III

Heidenhain-Welke com cortes soltos

- 1) água destilada 4 X 30 min (para retirar o formol)
- 2) sulfato férrico amoniacal 2,5% durante 3 horas no escuro (solução reutilizável).
- 3) água destilada tirar o excesso (rápido)
- 4) corante 2 horas
- 5) diferenciação:
Lavar 4 X 30 segundos em água destilada, álcool 70% 3 min, álcool 80% 3 min, álcool 70% 2 min, álcool 50% no tempo de montar na lâmina gelatinizada ou albuminizada.
- 6) deixar secar durante à noite e desidratar em álcoois 70%, 80%, 95%, 100% absoluto 3 minutos em cada e xilol I e II 3 minutos em cada, montar com Entellan e lamínula.

Reagente:

Lítio (LiCO_3)

300 ml de água destilada

2 cm de cristais de lítio no fundo

Hematoxilina 10%

100 gramas de hematoxilina

1000 ml de álcool absoluto 100%

Corante:

200 ml de água destilada

40 ml de hematoxilina

carbonato de lítio (LiCO_3) = em torno de 10 ml

OBS: Primeiro faz-se o teste para saber qual a proporção de lítio que vai se utilizar no definitivo.

O teste é feito na proporção de menos 10X do definitivo, ou seja;

20 ml água destilada

4 ml de hematoxilina

X ml lítio

O lítio é variado (X ml de solução saturada) geralmente de 0,6 à 1,6 ml / em degraus de 0,2 ml.

PERFUSÃO PARA FLUORESCÊNCIA

A PERFUSÃO DEVERÁ TER CINCO ETAPAS:

Salina 0,9 % - 3 litros

Paraformaldeído 4% em PBS - 3 litros

Paraformaldeído 4% em PBS e glicerol 2,5% - 2litros

PBS + glicerol 5% - 2 litros

PBS + glicerol 10% - 1 litros

OBSERVAÇÕES:

Para cada litro de Tampão Fosfato 0,1 M; adicionar 8,7 gramas de cloreto de sódio. (NaCl).

PBS + glicerol 5% : 50 ml de glicerol para 950 ml de PBS = 1litro

100 ml de glicerol para 1900 ml de PBS = 2 litros

PBS + glicerol 10% : 100 ml glicerol para 900 ml = 1000 ml

Para fazer 5 litros (5000 ml) de paraformaldeído (pó) 4% : 210 gramas de paraformaldeído dissolver em 5 litros de PBS, tirar 3 litros (pronto para uso).

Os 2 litros restantes acrescentar o glicerol 2,5% : 1950 ml de paraformaldeído 4% + 50 ml de glicerol.

OBS: Ouve uma correção no paraformaldeído, em vez de 200 gramas usamos 210 gramas;

Fazer a dissolução na capela pois o cheiro é muito forte.

Deve-se aquecer o PBS antes de colocar o paraformaldeído à 50-60° , e manter agitando até diluir, colocar algumas gotas de NaOH 2,5% até ficar limpo.

PERFUSÃO PARA PEROXIDASE

A perfusão deve ser feita em duas etapas:

Fixação com 4 litros de solução de glutaraldeído 1.25% e paraformaldeído 4%

200 ml glutaraldeído 25 %

40 gramas paraformaldeído

tampão fosfato 4.000ml (3.760ml)

diluição paraformaldeído: 40 gramas diluídas em 500 ml de água destilada na temperatura de 70°C, clarificar com Na OH (2,5%).

Tampão fosfato com sucrose 10%.

2000 ml TPO4 + 200 gramas sucrose

PERFUSÃO PARA TOXINA COLÉRICA.

A perfusão terá quatro etapas:

Salina 0,9 % 4 litros

Paraformaldeído 4% em PBS 1litro

Paraformaldeído 4% em PBS com Sucrose 10% 1 litro

Sucrose 30% em PBS 1 litro

Paraformaldeído 4%

200gramas para 5 litros correção do para 210 gramas.

40 gramas para 1 litro

80 gramas para 2 litros

Sucrose (Sacarose) 10 %

100 gramas para 1 litro

Sucrose 30 %

300 gramas para 1 litro

PÓS-FIXAÇÃO

Pós-fixação para retina ou cérebro.

Paraformaldeído 4% em PBS (durante 10 dias).

Trocar para paraformaldeído 4% em PBS + Sucrose 10% (durante 3 dias).

E então trocar para TPO4 + Sucrose 30% e deixar até afundar.

PROTOCOLO PARA BDA.

Adaptado de Reviller, Exp. Brain Research, 1994, 102; 227-243.

Injeção 0,2 µl > Solução BDA 5% em água destilada.

Fixação: paraformaldeído 4% + 0.2% de ácido pícrico em TPO4 0.1M, pH 7.4.

Reservar em tampão sucrose 10-30% de 2 a 7 dias.

IMUNOCITOQUÍMICA

1 - Lavagem em PBSb (2 vezes).

2 - Incubação no ABC (1:500 em TPO4 0.1M, pH 7.4) + Triton 0.5%, por 2 horas.
(8 gotas de A + 8 gotas de B em 20 ml de PBSb + 50µl de Triton).

3 - Lavar em PBSb (2 vezes).

4 - Pré-incubação com DAB 0.05% (50 ml DAB 0.05% + 50µl de H2O2 3%.
>5 ml DAB estoque + 45 ml PBSb + 50 µl H2O2 3%

5 - Lavar em PBSb

Para solução estoque de DAB 0.5%:

500 mg DAB em 95 ml de H2O destilada
5 ml TPO4 0.2M + 9g NaCl
Volume total: 100 ml

Guardar 5 ml em cada tubo Falcon de 50 ml. Estocar a -20°C.

BDA + TOX. COLÉRICA

- 1 – Lavar 2 vezes em PBS 0.1M pH 7.4
 - 2 – Incubar em H₂O₂ 0.3%/PBS por 20 min (0.1 ml de H₂O₂ + 9 ml de PBS 0.1M)
 - 3 – Lavar 2 vezes em PBS 0.1M
 - 4 – Incubar no ABC 2 horas. Diluição 1:500 em PBS (4 gotas de A + 4 gotas de B + 10 ml de PBS + 50µl de triton)
 - 5 – Lavar 2 vezes em PBS 0.1 M.
 - 6 – Incubar em DAB 0.05% + H₂O₂ 3% (5ml DAB estoque + 45 ml de PBS 0.1M + 50 µl de H₂O₂ 3% ou 5µl de H₂O₂ 30%).
 - 7 – Lavar 3 vezes em PBS 0.1M
 - 8 – Colocar no 4º passo do "NOVO PROTOCOLO PARA TOXINA COLÉRICA" pág 3 e seguir até o passo 11.
 - 9 – No passo 12 no lugar do DAB usar como corante o VECTOR SG CHROMOGEN + VECTOR SG HYDROGEN PEROXIDE SUBSTRATE REAGENTE (1 gota de CHOMOGEN + 1 gota de HYDROGEN PEROXIDE para 4 ml de PBS 0.1M).
- OBS.: Recomenda-se usar 3 gotas de cada reagente para 5 ml de PBS 0.1M (VECTOR SG)

CAT-301

- 1 – Lavar os cortes 4 vezes de 10 min. em PBSb.
- 2 – Lavar os cortes 10 min em H₂O₂ a 3%.
- 3 – Lavar os cortes 3 vezes de 10 min em PBSb.
- 4 – Lavar os cortes por 1 hora em diluente (albumina+PBSb+triton).
- 5 – Deixar os cortes no líquido acético com triton a 2%, overnight.
- 6 – Lavar os cortes 3 vezes de 10 min. em PBSb.
- 7 – Colocar os cortes no anticorpo secundário biotilado anti-mouse feito em cavalo mais o soro de cavalo. Para 10 ml de PBSb, 1 gota de biotilado e 3 gotas de soro de cavalo. Deixar por 2 horas.
- 8 – Lavar os cortes 3 vezes de 10 min. em PBSb.
- 9 – Colocar no ABC. Em vez de usar PBS como solvente da solução, usar o diluente que foi mencionado no 4º passo. Deixar por 2 horas.
- 10 – Lavar em PBSb 3 vezes de 10 min.
- 11 – Colocar no DAB (diluir o DAB 10 vezes).

Celestine Blue (comentários)

- 1) o Celestine blue é oleoso.
- 2) tentou-se várias concentrações diferentes do sulfeto ferrico e a melhor foi com o uso de 10 gramas.
- 3) pode preparar a solução de celestine blue e usar mais tarde (semanas, talvez meses).
- 4) a reação funciona melhor com material parafinado (onde a receita é ligeiramente diferente).

A receita para o Celestine Blue é:
sulfato de ferro e amônia 10 g
água destilada 250 ml
ácido clorídrico 0,5 ml
Celestine blue 1,5 g

Aquecer a água destilada pura e quando a água estiver morna adicionar o sulfeto de ferro e amônia, quando a solução começar a ferver adicionar o ácido clorídrico e quando começar a "subir" adicionar o Celestine Blue. Então tirar do calor imediatamente. Filtrar o corante depois de frio.

A receita para material parafinado sugere cortes de 8 micrometros de espessura e segue as seguintes etapas:

- 1) desparafinização - xilol I seguido de xilol II por 3 minutos
- 2) alcool absoluto - alcool I seguido por alcool II por 2 minutos
- 3) alcool 95% - alcool I seguido por alcool II por 2 minutos
- 4) alcool 70% - alcool I seguido por alcool II por 2 minutos
- 5) água destilada por 1 minuto
- 6) solução de Celestine Blue por 3 minutos se nova ou 5 minutos se mais velha; daí lavar com água destilada e ver se o azul "pegou", caso não tenha "prego" deixar mais tempo no celestine blue.

- 7) lavar com água destilada por 1 minuto
- 8) passar em ácido fúcsínico colocar e tirar rapidamente por 2 vezes (cerca de 1 minuto)
- 9) passar em ácido acético glacial por 1 minuto
- 10) lavar em água até clarear
- 11) lavar em água destilada rapidamente por 3 vezes
- 12) passar em álcool 95% rapidamente por 3 vezes
- 13) passar em álcool absoluto rapidamente por 3 vezes
- 14) passar em xilol I por 3 minutos
- 15) passar em xilol II por 3 minutos
- 16) montar com laminula

Como você pode notar na reação de material parafinado não entra hematoxilina (mas essa entra na reação para material cortado com criostato).

Modificação Edil-Ricardo para cortes em criostato.

Celestine Blue I

Método para cortes de congelação (criostato)

Cortes na lâmina e secos.

- 1) Fixador : etanol/formol 1 minuto
- 2) Lavar bastante com água destilada.
- 3) Iron sulfato de amônia 5 minutos
- 4) Lavar em água destilada
- 5) Celestine Blue 20 segundos a 10 minutos
- 6) Lavar em água corrente.
- 7) Hematoxilina de Mayer 5-10 minutos.
- 8) Lavar em água corrente 5-30 minutos
- 9) Formol 20% 2 minutos
- 10) Lavar em água destilada
- 11) Fucsina Ácida 1% 1 minuto
- 12) Ácido Acético glacial 1% 1 minuto
- 13) Lavar em água corrente (fica vermelho claro)
- 14) Água destilada
- 15) Desidratar nos álcoois e xilol
- 16) Entellan e cobrir com lamínula.

Soluções:

A) 31,2 gramas de $\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 1000 ml de água destilada.

B) 71,2 gramas de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 2000 ml de água destilada

ou 159,23 gramas de $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 2000 ml de água destilada.

Para perfusão:

Formaldeído tamponado 4%

300 ml da solução A

2000 ml da solução B

500 ml formaldeído concentrado

2200 ml de água destilada

Fixador

Formol Concentrado 10 ml

Etanol 95% 90 ml

Iron sulfato de amônia à 4% em água destilada
4gramas para 100 ml
12 gramas para 300 ml

Fucsina ácida à 1% em água destilada
1grama para 100 ml
3gramas para 300 ml

Hematoxilina de Mayer

Cristais de hematoxilina 1,0 grama
Água destilada 1000 ml
Iodato de sódio 0,2 gramas
Ammonium ou potassium alumínium 50,0 gramas
Ácido cítrico 1,0 ml
Hidrato de cloral 50,0 gramas

Corante Celestine Blue

10 gramas de sulfato de ferro e amônia
250 ml de água destilada
0,5 ml de ácido cítrico

Diluir o sulfato de ferro e amônia na água destilada e colocar para esquentar, daí colocar o ácido clorídrico, quando as bolhas começarem a subir, colocar imediatamente o Celestine Blue. Desligar o calor imediatamente. Depois que a solução estiver fria, filtrar o corante.

Celestine Blue- Fucsina Ácida

(Protocolo para ser usado no Lab de Fisiologia da Cognição)
para cortes montados em Tampão fosfato (0,005M)

Fixação: Formalina 4% tamponada, cortes de 5 μ em parafina.

PARA RETIRAR A PARAFINA.

- 1) Xyleno 2X3 min
- 2) Álcool absoluto 2X2 min
- 3) Álcool 95% 2 min
- 4) Álcool 70% 2 min
- 5) Água destilada 3 min
- 6) Celestine Blue 20 segundos até 10 minutos

COMEÇAR AQUI, QUANDO OS CORTES NÃO FOREM PARAFINADOS.

- 7) Lavar cuidadosamente em água corrente
- 8) Água destilada 2 min
- 9) Fucsina ácida 1% 1 min
- 10) Ácido acético glacial 1% 2-3 min
- 11) Lavar cuidadosamente em água corrente até o corante vermelho tornar-se vermelho claro.
- 12) Água destilada rapidamente.
- 13) Álcool 95% rapidamente
- 14) Álcool absoluto rapidamente
- 15) Xyleno 2X3 min
- 1) Montar as lâminas.

Soluções:

Ácido acético glacial 1%

Ácido acético glacial 2,5 ml

Água destilada 250 ml

Fucsina Ácida 1%

Fucsina ácida 2,5 gramas

Água destilada 250 ml

Celestine Blue

Sulfato férrico de amônia 5 gramas

Água destilada 250 ml

HCL (Ácido clorídrico) 0,5 ml

Aquecer a solução e quando a mesma estiver para ferver, acrescentar:

Celestine Blue 1,5 gramas e filtrar quando estiver frio.

OBS1: Não usar placa quente e sim bico de Bunsen.

OBS2: Usar um bastão de vidro para misturar.

OBS3: Utilizar ácido cítrico para limpar vidrarias manchadas pelo Celestine Blue.(1 grama para 100 ml de água destilada = 1%

Observações:

Devido a problemas com esta coloração aqui no Brasil, alguns passos da mesma foram modificados. O principal foi o equilíbrio entre o tom de azul e vermelho.

O background dessa coloração deve ser rosa claro, os neurônios viáveis devem mostrar-se marcadamente azulados e os neurônios inviáveis devem mostrar-se vermelho vivo.

Para tal resultado ,foi diminuído em 50% a concentração da fucsina ácida, bem como a concentração do ácido acético glacial. O tempo de exposição a esses corantes também foi significativamente reduzido (apenas um segundo em cada um).Em compensação, aumentou-se o tempo de lavagem na água e, principalmente, o tempo de exposição ao álcool.

C- Fos

Técnica imunohistoquímica para c-fos

1. Perfusão rápida com 1000 ml de solução salina 0,9%.
2. Perfusão com 2000 ml de solução de fixação tecidual preparada com paraformaldeído (4%) e ácido pícrico saturado diluídos em tampão fosfato (0,1 M e pH 7,4).
3. Terminada a perfusão, o cérebro do animal é cuidadosa e rapidamente retirado e pós-fixados na mesma solução de fixação utilizada na perfusão por um período de 90 minutos. Após, o cérebro deve ser protegido de artefatos de fixação pela impregnação com sacarose 10% diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 por dois dias.
4. Após a fase de crioproteção, o cérebro é congelado em gelo seco.
5. O seccionamento do tecido nervoso pode ser feito em criostato em uma temperatura de aproximadamente -20o C.
6. No procedimento imunohistoquímico, as secções são inicialmente incubadas com o anticorpo primário diluído em uma solução de PBS 0,1 M pH 7,4 contendo Triton X-100 a 0,3%. A concentração do anticorpo primário a ser utilizada é muito variável de acordo com o anticorpo empregado e condições experimentais, de forma que ela deve ser padronizada previamente. As secções ficam incubadas com o anticorpo primário por um período de 24 a 72 horas à temperatura de 4o C.
7. Após o período de incubação com o anticorpo primário, as secções são incubadas com um anticorpo secundário diluído na mesma solução do item anterior. Por exemplo, se o anticorpo primário que foi utilizado foi feito em coelho, então o anticorpo secundário deve ser um anticorpo anti coelho, desenvolvido por exemplo em cavalo. O período de incubação é de 1 hora à temperatura ambiente.
8. A seguir as lâminas contendo as secções devem ser incubadas com uma solução contendo avidina e biotina ambas diluídas em PBS 0,1 M pH 7,4 na mesma proporção. O período de incubação é, em geral, 45 minutos à temperatura ambiente.

9. Ao final deste período as lâminas são submetidas à reação enzimática colorimétrica empregando-se um cromógeno doador de cor. A reação que proporcionará, às células, cor marrom é feita utilizando-se a di-aminobenzidina tetrahidrocloro (DAB) como cromógeno a uma concentração de 0,03% diluída em Tris pH 7,7 contendo 0,05% de H₂O₂ como substrato. O período de reação é de aproximadamente 6 minutos.

10. A seguir as secções são desidratadas e então cobertas com lamínulas utilizando-se o Entellan como meio de montagem.

REAÇÃO DE CITOCROMO OXIDASE

Pré-incubação em temperatura ambiente por 15 min na seguinte solução:

250 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4
1,2 ml de DMSO
6,0 ml de cloreto de cobalto 1%

Lavar 3 vezes 5 min em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

Incubar a 40 °C, no escuro e com aeração por aproximadamente 2 horas na seguinte solução:

250 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4
125 ml de DAB
0,6 ml de DMSO
10 mg de catalase
25 mg de citocromo C

Lavar 2 vezes em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

Manter 30 min em formol tamponado (formaldeído 4% + tampão fosfato 0,1 M + glicerol 20%)

Desidratar em série de concentrações crescentes de álcool etílico (75%, 90%, 100%) de 15 min de duração cada.

Deixar 15 min em xileno e montar as lamínulas.

Comentários sobre a Citocromo Oxidase.

A incubação pode ser feita vários dias após o corte.

Antes de começar a trabalhar com DAB, forar toda a bancada com papel, usar luvas e depois de terminado o trabalho, deve-se limpar a bancada e demais utensílios com água sanitária pois o DAB e o cobalto são cancerígenos.

Para cada cuba de vidro:

250 ml de tampão fosfato 0,1M
1,2 ml de DMSO
6,0 ml de cloreto de cobalto 1%.

Deixar durante 15 minutos.

Lavar 3 vezes em TPO4 0,1M durante 5 minutos.

Incubar à 40° C no banho-maria.

Para cada cuba:

250 ml TPO4 0,1M

0,6 ml de DMSO

10 miligramas de catalase

25 miligramas de Citocromo C.

125 miligramas de DAB.

OBS: 40°C, borbulhar com O₂. Colocar as caixinhas após atingir a temperatura e saturar com O₂.

Cuidado com o precipitado: checar a formação de grãos no meio da incubação, após cerca de 3 horas.

Resultado:

Regiões marrom escuro(blobs, bandas).

Regiões alaranjadas (outras partes do córtex)

Regiões amarelo claro(substância branca)

Lavar 2 vezes em TPO4 0.1M e depois manter durante 30 minutos em formol tamponado 10 %.

Desidratar, desengordurar,cobrir com Entellan.

OBS: A vidraria deverá ser lavada cuidadosamente com sulfocrômica antes do uso e após o uso deverá inativar o DAB com água sanitária.

REAÇÃO DE CITOCROMO OXIDASE .

Pré-incubação em temperatura ambiente por 15 min na seguinte solução:

250 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

1,2 ml de DMSO

6,0 ml de cloreto de cobalto 1%

Lavar 3 vezes 5 min em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

Incubar a 40 °C, no escuro e com aeração por aproximadamente 2 horas na seguinte solução:

250 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

125 ml de DAB

0,6 ml de DMSO

10 mg de catalase

25 mg de citocromo C

Lavar 2 vezes em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

Manter 30 min em formol tamponado (formaldeído 4% + tampão fosfato 0,1 M + glicerol 20%)

Desidratar em série de concentrações crescentes de álcool etílico (75%, 90%, 100%) de 15 min de duração cada.

Deixar 15 min em xileno e montar as lamínulas.

Comentários sobre a Citocromo Oxidase.

A incubação pode ser feita vários dias após o corte. Antes de começar a trabalhar com DAB, forar toda a bancada com papel, usar luvas e depois de terminado o trabalho, deve-se limpar a bancada e demais utensílios com água sanitária pois o DAB e o cobalto são cancerígenos.

Para cada cuba de vidro:

- 250 ml de tampão fosfato 0,1M
- 1,2 ml de DMSO
- 6,0 ml de cloreto de cobalto 1%.

Deixar durante 15 minutos.

Lavar 3 vezes em TPO4 0,1M durante 5 minutos.

Incubar à 40° C no banho-maria.

Para cada cuba:

- 250 ml TPO4 0,1M
- 0,6 ml de DMSO
- 10 miligramas de catalase
- 25 miligramas de Citocromo C.
- 125 miligramas de DAB.

OBS: 40°C, borbulhar com O₂. Colocar as caixinhas após atingir a temperatura e saturar com O₂.

Cuidado com o precipitado: checar a formação de grãos no meio da incubação, após cerca de 3 horas.

Resultado:

Regiões marrom escuro(blobs, bandas).

Regiões alaranjadas (outras partes do córtex)

Regiões amarelo claro(substância branca)

Lavar 2 vezes em TPO4 0.1M e depois manter durante 30 minutos em formol tamponado 10 %.

Desidratar, desengordurar,cobrir com Entellan.

OBS: A vidraria deverá ser lavada cuidadosamente com sulfocrômica antes do uso e após o uso deverá inativar o DAB com água sanitária.

WISTERIA FLORIBUNDA

DEMONSTRAÇÃO DE LEKTINA HISTOQUÍMICA DE REDES PERINEURAIS COM AGLUTININA WISTERIA FLORIBUNDA

(LEKTIN-HISTOCHEMISCHICAL DEMONSTRATION OF PERINEURAL ETS WITH BIOTINYLATED WISTERIA FLORIBUNDA AGGLUTININ (WFA).

1. 3x 10 min. lavar em 0,1 M TBS (tampão tris salina) pH 7,4
 2. 30 min. 0,1 M TBS/ 0,6% H₂O₂ (ÁGUA OXIGENADA)
 3. 3X 10 min. Lavar em 0,1M TBS pH 7,4
 4. WFA 0,5 (-10µg) ml em 0,1M TBS/2% BSA, (2 horas em temperatura ambiente, agitando) ou 16 horas em 4° C (na geladeira).
 5. 3X 10 min. Lavar em 0.1M TBS pH 7.4
 6. ABC Elite 1:250 em 0,1M TBS por 2-3 horas em temperatura ambiente, agitando (e.g. 40 µl A, 40 µl B, 9920 µl TBS)
- Obs: ABC deve ser misturado 30 min.antes de usar.
7. 2X 10 min.lavar em 0,1M TBS.
 8. 1X 10 min. lavar em 0,1M TRIS pH 7,6
 9. 5 min.DAB- Ni pré-incubação
 10. DAB-Ni incubação (e.g. 2 mg DAB, 40 mg Sulfato de Níquel Amoniacal (Ammoniumnickelsulfat-6-sulfat), 10 ml 0,1M Tris-HCl pH 7,6; 8µl 30% H₂O₂ (incubação < 10 minutos)

OBS: Usar metade do DAB- solução sem H₂O₂ para pré-incubação, acrescentar H₂O₂ ao restante e misture com a solução contendo as secções).

11. 3X10 min.lavar em TBS (tampão tris salina).

12. Montar o corte, desidratar e cobrir.

13. WFA: Sigma L-1766, lote 26 F8100

PLP (Paraformaldeído/Lysina/Periodade) Fixação

Solução A: 1.61:solve 21.8g lysina-HCL em 600 ml de água destilada

2.41: 32.7g 900ml

5.01: 68.15g 1.875ml

acrescentar 0,1M Na₂HPO₄ até o pH 7,4 então encha com 0,1M de tampão fosfato até

1200 ml (1.61)

1800 ml (2.41)

3750 ml (5.01)

acrescentar 92.16g (1.61) Sucrose

138.24g (2.41)

288g (5.01)

e coloque no gelo

Solução B: 1.61: 64g paraformaldeído em 400 ml de água destilada

2.41: 96g 600 ml

5.01:200g 1.250 ml

Aquecer a água destilada a 60° C, acrescentar 4 gotas de NaOH/1 40% no volume final, acrescentar PFA lentamente enquanto agita lentamente. A solução deverá estar completamente limpa! Então coloque a solução PFA no gelo.

ajustar o pH 3,3

0,01n citrate buffer: 25 ml 0,2n citrate buffer
475% água destilada

0,5% vermelho neutro: 1.25g vermelho neutro
250 ml 0.01n citrate buffer
manter agitando (durante toda a noite)!

Comentários:

"The print out of the perfusion protocol gives the amounts necessary for either 1.6l, 2.4l, or 5l of final perfusion solution. The amounts necessary for a certain solution are recognizable by the final amount given in parentheses. For example, for 5l you need:

68.15g Lysin in 1875ml H₂O, adjust with 0.1M Na₂HPO₄ to pH 7.4, then fill with 0.1M phosphate buffer pH 7.4 to 3750ml. Part B: 200g paraformaldehyde in 1200ml H₂O, Part C: 21.4g NaIO₄. We add 288g Sucrose.

We always postfix over night and do cryoprotection as we always did at NIH: over night in 10% glycerol and 3-4 days in 20% glycerol before freezing in isopentane at -70°."

Claudia Distler

LECTINAS

Lectinas são proteínas de origem não imunológica que aglutinam e/ou precipitam carboidratos complexos. A atividade de aglutinação é altamente específica e pode ser inibida por uma simples monossacarídeo. As lectinas são isoladas de vegetais, fungos, bactérias, moluscos, esponjas, ovos de peixes, vertebrados e invertebrados e de membranas celulares de mamíferos.

As lectinas são conjugadas a enzimas, fluorocromo, marcadores eletrodensos, etc... , e isto não altera a especificidade da lectina.

N-acetylgalactosamina (gal/Nac) liga-se a lectina xtraída de *Wisteria floribunda* (Japanese wisteria).

Lectin	MolWt x 10 ⁻³	Price U\$S	Specificity	Conjugates
<i>Arachis hypogaea</i>	120	1mg/26.30	GalNAc	F, TR, B, AG
<i>Bandeiraea simplicifolia</i>	114	1mg/41.50	GalNAc	Px, B
<i>Caragana arborescens</i>	60	1mg/46.00	GalNAc	F, TR, B
<i>Dolichos biflorus</i>	140	1mg/33.90	GalNAc	F, TR, Px, B
<i>Maclura pomifera</i>	40	1mg/70.10	GalNAc	F, TR, B
<i>Phytolacca americana</i>	32	1mg/15.10	GalNAc	F, TR, B
<i>Vicia villosa</i> A ₄	134	1mg/32.30	GalNAc	B
<i>Vicia villosa</i> B ₄	143		GalNAc	Px, B
<i>Wisteria floribunda</i>	68	1mg/65.10	GalNAc	F, B

RAPID SENSITIVE HISTOCHEMICAL STAIN FOR MYELIN

L. C. Schmued 1990

J Histochem Cytochem, 1990 May, 38:5, 717-20

Abstract

A staining technique is described whereby frozen brain sections are incubated in a vehicle containing gold chloride. After 2-4 hr in this solution, both large myelinated bundles and fine individually myelinated fibers are darkly stained. Advantages of this technique over conventional myelin stains include speed, sensitivity, metachromatic staining, and compatibility with formalin-fixed and frozen cut sections. Possible histochemical mechanisms are discussed.

Method

1. Perfusion: Paraformaldehyde 4% in 0.1 M phosphate buffer (PB)
2. Post Fixation in the same fixative plus 20% sucrose.
3. Freeze sectioning in a cryostat (20-30um)
4. REACTION.
 - 4.1. Staining solution: 0.2 % gold chloride (hydrogen tetrachloroaurate trihydrate) dissolved in 0.02 M neutral PB and 0.9% sodium chloride.
 - 4.2. Incubation: 3-4 h. Monitor under the microscope until obtaining the desired degree of impregnation.
 - 4.3. Rinsing: 30 minutes in ... water.
5. Sections are air-dried, dehydrated in alcohol or Nissl counterstained, and coverslipped with either aqueous or non-aqueous mounting medium.

Results

Brown staining of large myelinated bundles after 1 hour under naked-eye inspection.

Slight staining of gray matter after 2 hours with black filament-like structures under microscopic examination. Fine opaque fibers in layer I. Fine black and thicker brown radially oriented fibers in deepcortex. Unmyelinated axons and terminals as well as densely cell-packed regions are not stained.

The staining is compatible with Nissl stain, HRP histochemistry and fluorescent tracing.

TOXINA COLÉRICA.

Protocolo original

Colocar em cada poço (6 poços) 1 ml de todos os reagentes, para cada reação feita.

- 1 - Lavagem em PBS (3 vezes) 10 min cada lavagem.
- 2 - Lavar em H₂O₂ 3%+ PBS 10 min (1:10, ou seja, 1ml de H₂O₂ para 9ml de PBS, pois a água oxigenada está a 30%)
- 3 - Lavar em PBS 10 min (3 vezes)
- 4 - Colocar os cortes em soro 5% (0,5ml de soro de cabra + 10 ml de PBS) e acrescentar 3,0 \square l de Triton (0,3%). Deixar os cortes 30 min. nesta solução
- 5 - Lavar em PBS (3 vezes) 5 min cada
- 6 - Incubar com anticorpo primário contra toxina colérica 1:10.000 (1 \square l para 10ml) deixando por 2 horas.
- 7 - Lavar com PBS (3 vezes) 5 min cada
- 8 - Incubar com Brotinilado Nector Goat (anti- rabbit) 1:200 (1 gota para 10 ml de PBS), deixando por 2 noites.
- 9 - Lavar PBS (3 vezes) 5 min cada
- 10 - Colocar na solução ABC por 2 horas. Preparo: para cada 10 ml de PBS, colocar 2 gotas de A + 2 gotas de B, agitar e esperar 20 min para acoplar e só depois colocar sobre os cortes.
- 11 - Lavar em PBS (3 vezes) 5min cada
- 12 - Reação com DAB 0,05% (para cada poço 3 ml, total por caixa 20 ml) Preparo: 2 ml de DAB 5% + 18 ml de PBSb (PBSb = PBS diluído 10X) + 20 \square l de H₂O₂ 3%(2 \square l de H₂O₂ + 18 \square l de H₂O destilada)

13 - Incubar por 3 min (máximo de 5 min)

14 - Lavar 1 vez em PBS para retirar o excesso de DAB

15 - Montar as lâminas em PBS

* - Para montar no dia seguinte, lavar 2 vezes em PBS e colocar na geladeira.

NOVO PROTOCOLO - TOXINA COLÉRICA.

- 1 – Lavar 3 vezes em PBS 0.1M (5 min cada lavagem);
- 2 – Incubar em H₂O₂ 0.3% em PBS por 20 min;
- 3 – Lavar 3 vezes em PBS 0.1M (5 min cada lavagem);
- 4 – Lavar em glicina 0.1M por 30 min;
- 5 – Lavar em PBS 3 vezes (5 min cada lavagem);
- 6 – Incubação em soro normal de cabra 4 a 5% + 2,5% albumina de soro bovino (BSA) e 0.3 a 0.5% Triton X-100 em PBS – overnight a 4 °C;
- 7 – Lavar 2 vezes em PBS 0.1M (5 min. cada lavagem)
- 8 – Incubação em anticorpo primário CTB diluição 1:4000 em PBS contendo 2% NRS (soro normal de cabra) 2.5% BSA + 2%Triton X-100 por 2 dias na temperatura ambiente ou 4 dias a 4 °C;
- 9 – Lavar por 1 h (3 ou 4 mudanças) em PBS (4 lavagem de 15 min. cada);
- 10 – Lavar 10 min em 2% soro normal de cabra + 2.5% BSA em PBS;
- 11 – Incubação no anticorpo biotilado cabra anti-rabbit diluído 1:200 + 2% soro normal de cabra + 2.5% BSA + 1% Triton X-100 em PBS – 1 hora;
- 12 – Lavar 1 hora em PBS (4 lavagem de 15 min cada);
- 13 – Lavar 10 min em soro normal de cabra 2% + 2.5% BSA em PBS;
- 14 – Incubação no kit ABC diluição 1:100 em PBS por 1 hora

- 15 – Lavar 4 vezes em PBS (15 min cada lavagem);
- 16 – Lavar 2 vezes em tampão Tris 0.05M pH 7.4;
- 17 – Incubação em cloreto de cobalto (CoCl_2) 0.5% em tampão Tris pH 7.4 por 10 min;
- 18 – Lavar 1 min em tampão Tris;
- 19 – Lavar 2 vezes em PBS (5 min cada lavagem);
- 20 – Resclar 0.025% DAB em PBS + 0.004% H_2O_2 por 5 min;
- 21 – Lavar 5 vezes em PBS para parar a reação (1 min cada lavagem).

** Como alternativa, após o passo 14 (Incubação no ABC), os cortes são lavados por 1 hora (4 vezes de 15 min cada lavagem) em PBS e incubado em VIP (vector) por 3 a 5 min (cor roxa) – Reação é parada por lavagem 2 lavagem (5 min cada) em água destilada.

PROTOCOLO ZENK

Animal perfundido com Paraformaldeído 4%, 40 min, sacarose 10 e 30%.

Recolher os cortes de 20µm em lâminas gelatinizadas.

1 - Tirar as lâminas do freezer e deixa-las secarem (30 mim. Aproximadamente).

2 - Lavagem com PB (tampão fosfato 0.1M) por 30 min. (3 lavagens de 10 min).

3 - Incubar com tampão bloqueador por 1 hora com:

- 1,5 ml de leite desnatado (do dia!!!)
- 1,5 ml de triton 10%
- 50 ml de tampão fosfato 0,1M
- 0,25 mg de albumina.

* Obs.: O leite tem que ser do dia. Abriu a caixinha, faça o tampão, faça a alíquota e congele (-20 °C). Nunca use o leite desnatado aberto no dia anterior.

4 - Lavagem com PB (3 vezes de 10 min cada).

5 - Incubação com anticorpo primário (testar diluição). Deixar por 2 horas na temperatura ambiente + overnight a 4 °C.

6 - Lavagem com PB (3 vezes de 10 min. cada).

7 - Incubar com secundário biotilado por 2 horas (1:200 - no diluente).

8 - Lavagem com PB (3 vezes de 10 min. cada).

9 - Incubação com ABC (1:100 no PB) por 2 horas na temperatura ambiente.

10 - Revelar com DAB.

Solução para revelação:

- 240 ml de tampão fosfato 0.1M

- 320 mg de sulfato de níquel amoniacal
- 4 ml de solução de DAB (10mg/ml)

FILTRAR!!!

Na hora de colocar as lâminas dentro da cuba, adicionar 400 µl de H₂O₂ 30% e misturar.

Deixar as lâminas por 5 min., retirar e colocar no PB. Olhar no microscópio e voltar para a solução de DAB até o contraste ideal com background baixo. Após achar o ponto ideal, passar as lâminas para a água destilada, passar em série de álcoois, xilol e cobrir.

ÍNDICE ALFABÉTICO

Notas: