

## **INCLUSIÓN EN PARAFINA (hibridación in situ en cortes)**

1. Diseccionar el material y lavar en PBS estéril.
2. Fijar en paraformaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche (14-16 horas).
3. Lavar brevemente en PBS estéril.
4. Deshidratar en alcohol de 70° durante 30 min-3 horas.  
*En este paso se puede almacenar durante una semana.*
5. Deshidratar en alcohol de 80° durante 30 min-3 horas.
6. Deshidratar en alcohol de 90° durante 30 min-3 horas.
7. Deshidratar en alcohol absoluto durante 30 min-3 horas.
8. Clarear la muestra con alcohol N-butílico durante toda la noche.
9. Incluir en parafina (paraplast) I durante 30 min-2 horas  
*Desechar el paraplast una vez que se ha usado.*
10. Incluir en parafina (paraplast) II durante 30 min-2 horas.  
*Pasar el paraplast II a paraplast I una vez que se ha usado.*
11. Incluir en parafina (paraplast) III durante 30 min-2 horas.  
*Pasar el paraplast III a paraplast II una vez que se ha usado.*
12. Confeccionar el bloque de parafina, orientando la pieza en el plano deseado para su posterior corte en el microtomo.  
*Pasar el paraplast III a paraplast II una vez que se ha usado.*

### **Reactivos**

#### **4% PFA**

Disolver 4 gramos de paraformaldehído en 100 ml de PBS estéril.

### **Nota**

Los tiempos de deshidratación e inclusión en parafina dependen del volumen de la muestra. Si estamos tratando embriones de <E10.5 el tiempo recomendado es de 30 minutos, si los embriones son de >10.5 y <14.5 el tiempo recomendado es de 1 hora y si son de >E14.5 y <E6.5 sería de 2 horas. En el caso de tejidos adultos oscila entre 2 y 3 horas.