**IMUNO-HISTOQUÍMICA**

1. **Preparo das lâminas**

* Colocar lâminas dentro da estufa por 1 hora a 100ºC, assim que a estufa atingir a temperatura;
* Imergir lâminas por 30 minutos em Xilol;
* Aguardar secar o xilol;
* Imergir lâminas em álcool absoluto por 5 minutos;
* Deixar imerso em álcool 95% por 4 minutos;
* E por último deixar imerso em álcool 75% por 3 minutos;

**Observação: Deixar panela aquecendo com trilogy a 250ºC (diluição - 1500ul), no banho-maria com 150ml de água deionizada, por 15 minutos antes de inserir as lâminas.**

1. Levar as lâminas para dentro do trilogy com a panela **ligada** – para recuperação antigênica a 130ºC – por 15 minutos;
2. Manter por mais 15 minutos dentro do trilogy com a panela **desligada**;
3. Retirar o recipiente com trilogy e as lâminas de dentro da panela e deixar esfriar por 5 minutos;
4. Colocar lâminas em tampão¹ por 10 minutos (**diluir 50ml de TBS em 950ml de água deionizada**);

**Observação**: Se começar o processo de imuno-histoquímica pela manhã, pode-se utilizar o mesmo tampão durante todo o processo, senão, se começar no final do dia, deve-se trocar o tampão antes de continuar o processo no próximo dia.

1. Secar o produto em volta do corte (**e fazer isso todas as próximas vezes que haver aplicação de novo reagente**) e aplicar o bloqueador de peroxidase (*Peroxide Block*), por 10 minutos;
2. Levar para o tampão por 10 minutos;
3. Secar o produto em volta do corte e aplicar o bloqueador de fundo (*Background Block*) por 10 minutos;
4. Leve ao tampão por mais 10 minutos;
5. Seque e aplique o anticorpo (vide manual para diluição do anticorpo) por 2 horas ou *Overnight* (caso o processo de imuno-histoquímica tenha sido iniciado no fim do dia);
6. Levar as lâminas ao tampão por 10 minutos;
7. Seque e aplique o amplificador (*Amplifier* – frasco contém tampa amarela) por 35 minutos;
8. Leve ao tampão por 10 minutos;
9. Seque e aplique o polímero (*Polymer* – frasco contém tampa vermelha) por 25 minutos;
10. Tampão por 10 minutos;
11. Após tirar lâminas do tampão leve-o ao DAB² (DAB Buffer – vide diluição no final das instruções) por 15 minutos;
12. Lavar em tampão (mergulhar e tirar por alguns segundos);
13. Após último tampão deixar 40 segundos na hematoxilina (ou seguindo padronização do momento) e lavar em água corrente (da torneira mesmo, mas sem deixar a água bater nas lâminas) para tirar excesso.
14. Passar em 3 potes com álcool absoluto (mergulhando), e fechar lâminas.