

ANEXO 1. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICO

Las muestras han sido previamente incluidas en parafina, cortadas en secciones de 4-5 μm e incubadas durante toda la noche a 56°C.

1. Proceso de desparafinar/hidratar:

Xilol: 5 min (x2)

Etanol 99%: 5 min (x2)

Etanol: 96%: 3 min

Etanol 70%: 3 min

Lavado con agua destilada (5min)

2. Pretratamiento para el desenmascaramiento del epítipo:

Bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO, Glostrup – *Denmark*, *peroxidase blocking solution*; 5 min).

Lavado en PBS buffer (5 min) (x2).

PT Link citrato buffer de pH básico (20 min a 96°C).

Lavado en PBS buffer (20 min).

Horse serum al 3% (2 horas a T^a ambiente).

3. Incubación del anticuerpo primario (Olig2; Abcam, Amsterdam – *Netherlands* 1/500) (4°C toda la noche).

Lavado en PBS 5 min (x3).

4. Incubación con el polímero anti-rabbit Envision (DAKO) (30 min a T^a ambiente)

Lavado en PBS 5 min (x3).

5. Revelado con DAB+ (diaminobencidina; Envision-DAKO, 1gota/ml buffer; 10 min)

Lavado en PBS 5 min (x3).

6. Contra-tinción con hematoxilina (10 min)

Lavado con agua destilada.

7. Proceso de deshidratación:

Alcohol 70°: inmersión (x3)

Alcohol 96°: inmersión (x3)

Alcohol 100°: inmersión (x3)

Alcohol 100°: inmersión (x3)

Xilol: inmersión (x3)

8. Montaje en porta con DPX y secado (T^a ambiente)