

## **Anexo 1.**

### **3.3.1 Tinción de IHQ para la detección de células T utilizando el anticuerpo policlonal anti-human CD3**

1. Desparafinar con xilol e hidratar en una batería de alcoholes y agua corriente
2. Lavar los portaobjetos con PBS: 3 cambios de 5 min
3. Pre-tratamiento en olla presión con tampón citrato 10mM pH 6 durante 3 min
4. Enfriar los cortes con agua destilada durante 10 min
5. Bloquear la peroxidasa endógena durante 10 min
6. Lavar de nuevo con PBS: 3 cambios de 5 min
7. Aplicar el anticuerpo primario dilución 1/100 en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 45 min.
8. Lavar con PBS: 3 cambios de 5 min
9. Incubar con el polímero marcado (EnVision™Rabbit) 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente
10. Lavar con PBS: 3 cambios de 5 min
11. Revelado de la peroxidasa con el sustrato DAB durante 8 min
12. Lavado con agua destilada: 5 min
13. Contrastar con hematoxilina de Mayer durante 8 min
14. Deshidratar la muestra con etanol 96% y al 100%
15. Aclarar con xileno 2 cambios
16. Montaje en medio no acuoso DPX

### **3.3.2 Tinción de IHQ para la detección de células B utilizando el anticuerpo monoclonal anti-human CD79α**

1. Desparafinar con xilol e hidratar en una batería de alcoholes y agua corriente
2. Lavar los portaobjetos con PBS: 3 cambios de 5 min
3. Pre-tratamiento en olla presión con tampón citrato 10mM pH 6 durante 3 min
4. Enfriar los cortes con agua destilada durante 10 min
5. Bloquear la peroxidasa endógena durante 10 min
6. Lavar de nuevo con PBS: 3 cambios de 5 min
7. Aplicar el anticuerpo primario dilución 1/80 en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 45 min.
8. Lavar con PBS: 3 cambios de 5 min
9. Incubar con el polímero marcado (EnVision™Mouse) 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente
10. Lavar con PBS: 3 cambios de 5 min
11. Revelado de la peroxidasa con el sustrato DAB durante 2 min
12. Lavado con agua destilada: 5 min
13. Contrastar con hematoxilina de Mayer durante 5 min
14. Deshidratar la muestra con etanol 96% y al 100%
15. Aclarar con xileno 2 cambios
16. Montaje en medio no acuoso DPX

### 3.3.3 Tinción de IHQ para la detección de pestivirus utilizando el anticuerpo monoclonal 15C5

1. Desparafinar con xilol e hidratar en una batería de alcoholes y agua corriente
2. Lavar los portaobjetos con PBS: 3 cambios de 5 min
3. Pre-tratamiento enzimático tripsina-quimiotripsina a 37°C durante 10 min
  - 0,25 g de tripsina
  - 0,25 g de  $\alpha$ -quimiotripsina
  - 0,5 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
  - 500 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$  a 37°C
4. Lavar inmediatamente con agua corriente durante 5 min
5. Inhibición de la peroxidasa endógena durante 30 min
6. Lavar con agua corriente durante 5 min
7. Lavar de nuevo con PBS: 3 cambios de 5 min
8. Aplicar el anticuerpo primario dilución 1/40.000 en una cámara húmeda a 4 °C toda la noche
9. Lavar con PBS: 3 cambios de 5 min
10. Incubar con el polímero marcado (EnVision™ Mouse) 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente
11. Lavar con PBS: 3 cambios de 5 min
12. Revelado de la peroxidasa con el sustrato DAB durante 4 min
13. Lavado con agua destilada: 5 min
14. Contrastar con hematoxilina de Mayer durante 5 min
15. Deshidratar la muestra con etanol 96% y al 100%
16. Aclarar con xileno 2 cambios
17. Montaje en medio no acuoso DPX

#### Inmunohistoquímica. Preparación de PBS (tampón fosfato salino)

- NaCl            8 g
- KCl             0,2 g
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$       1,15 g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$        0,5 g

Enrasar a 1l con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. En caso de necesidad, el pH puede ser ajustado con HCl o NaOH.

Este tampón ha sido utilizado en la técnica de inmunohistoquímica.