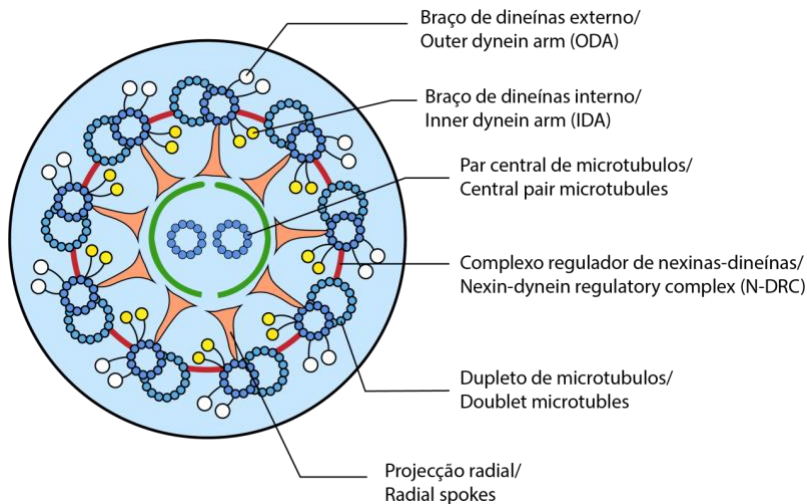


AULAS P3 e P4: Imunohistoquímica de fluorescência (IF) para diagnóstico da Discinesia Ciliar Primária (DCP)

A DCP é uma doença rara que afeta 1:10,000 pessoas. O diagnóstico é complexo e multidisciplinar. Uma das técnicas de diagnóstico implica detetar a presença de 4 proteínas constituintes dos cílios móveis: DNAH5 (ODA); DNALI1 (IDA); RSPH9 (projeção radial); GAS8 (N-DRC)



Os alunos vão formar 4 grupos e cada grupo irá detetar uma destas proteínas numa pessoa com rinite alérgica e numa pessoa aparentemente saudável. Logo, cada grupo terá 2 lâminas numa caixa.

Procedimentos:

Dia 1

- Planeie a experiência considerando que é necessário ter uma lâmina de amostra controlo para cada anticorpo que será testado.
- Descongelar os slides (20-30 min).
 - Limpe a lâmina (ao redor do esfregaço de células) e use uma caneta hidrofóbica para criar uma barreira. Deixe secar.
 - Rotular as lâminas (ID do paciente, anticorpo + diluição, data).
 - Construa uma câmara húmida para os slides usando uma caixa com papel molhado.
- Lave as lâminas com solução salina tamponada com fosfato a 1% (PBS) por 5 min.
- Incubar com paraformaldeído a 4% (PFA) durante 15 min.

A AULA 1 COMEÇA AQUI:

-preparar a solução de leite desnatado que fará de solução bloqueadora (1).

- Lavar as lâminas 2-3x vezes com PBS e incubar com 0,2% Triton-X durante 10 min.
- Lave as lâminas 5-6x com PBS.
- Bloquear: incubar as lâminas com leite desnatado 1% durante a noite a 4°C.**

(1) solução de leite desnatado a 1%: para 30mL de solução:

- Pesar 0,3g de leite em pó.
- Misture o pó com 30mL de PBS.

Dia 2

- a. Retirar o leite vertendo a lamina.
- b. Incubar as lâminas com os anticorpos primários (200uL para cada lâmina) durante 3-4 horas à temperatura ambiente OU durante a noite a 4°C.
 - Usar o leite desnatado da última aula para diluir os anticorpos.
- c. Guardar o excesso a -20°C.

A AULA 2 COMEÇA AQUI:

- d. Lavar as lâminas 5-6x com PBS.
- e. Mantenha os slides numa caixa escura.
- f. Incubar lâminas com anticorpos secundários (200uL para cada lâmina) por 30min em temperatura ambiente, diluídos em 1% de leite desnatado.
- g. Lavar as lâminas 5-6x com PBS.
- h. Incubar lâminas com DAPI por 10 minutos (diluição: 1:500 em PBS).
- i. Lavar as lâminas 5-6x com PBS.
- j. Deixe os slides secarem (não completamente!)
- k. Use 1-2 gota de meio de montagem aquoso (Dako) e cubra as lâminas com lamelas.
- l. Deixe secar numa caixa escura por uns minutos.
- m. Observe as lâminas ao microscópio de fluorescência Olympus BX60. Use os canais (Brightfield, DAPI, Alexa 488, Alexa 546).
- n. Identifique as células com a objetiva de 10x e depois mude para a objetiva de 40x (requer óleo de imersão).
- o. ajuste a intensidade do laser para cada canal. Observe que as configurações devem ser semelhantes para todas as células analisadas para o mesmo anticorpo específico.
- p. Selecione todos os canais e tire uma foto da célula.
- q. Guardar as imagens especificando qual anticorpo primário e com qual fluoróforo do anticorpo secundário (Alexa 488 ou Alexa 546).
- r. Analise cerca de 10 células por anticorpo primário para cada lâmina.
- s. O processamento da imagem é realizado utilizando o software Image J (Fiji).

Material geral por turma: Haverá 4 grupos por turma: 4 caixas com papel de alumínio e papel molhado; 8 laminas, 8 lamelas, 8 falcons 50ml com PBS, 4 falcons 15ml com 0,2% triton-X, lata de leite desnatado, colher de pesagem, papel de alumínio, balança, falcon com solução de anticorpos secundários, falcon com DAPI, DAKO meio de montagem, papel absorvente.

Em cada tabuleiro por grupo aula 1: 1 caixa com 2 lâminas e 1 caneta hidrofóbica, 2 falcons 50ml com PBS, 1 falcon 15ml com 0,2% triton-X, leite em pó em papel de alumínio já pesado.

Em cada tabuleiro por grupo aula 2: 1 falcon 50ml PBS, 1 falcon com solução de anticorpos secundários, 1 falcon com DAPI, 1 pendorf com DAKO.