

PTEN - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Clone (6H2.1)

Mouse anti-human PTEN Monoclonal Antibody (Clone 6H2.1)

Código	EP-12-52693	1ml
• Diluição recomendada	:	1:100
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	6H2.1
• Isotipo Ig	:	Camundongo IgG2a/k
• Imunógeno	:	C-terminal 100 aminoácidos de PTEN
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Endométrio, próstata
• Marcação	:	Citoplasma celular e Núcleo

Aplicações conhecidas

Em Imuno-histoquímica (IHQ) para uso em tecidos embebidos em parafina. Não testado em tecidos congelados e técnicas de western-blotting.

Especificações:

O anticorpo reconhece uma fração proteica de 403 aminoácidos codificada pelo gene PTEN localizado na região do cromossomo 10q23.3. A proteína PTEN atua como uma fosfatase de dupla especificidade. Por um lado, desfosforila as proteínas fosforiladas nos resíduos tirosina, serina e treonina e, por outro lado, atua como uma fosfatase lipídica, removendo o grupo fosfato da posição D3 do anel inositol em fosfatidilinositol-3,4,5- trisfosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato, fosfatidilinositol-3-fosfato e inositol 1,3,4,5-tetraquisifosfato. Esta última característica é fundamental para atuar como um supressor de tumor através da regulação negativa da via de sinalização PI3K-AKT / PKB. Este último controla a progressão do ciclo celular, o desenvolvimento do tecido, a migração celular e a inibição da apoptose. Nesta via de sinalização, o efeito antagonista do PTEN na PI3K-AKT / PKB também mantém a estabilidade da p53. O PTEN também controla outras proteínas do ciclo celular, como p27, p130, myc e ciclina D1. Mutações no gene PTEN induzem alterações no funcionamento das células de forma que a perda da expressão da proteína PTEN está associada à gênese do tumor, progressão do câncer e resistência ao câncer para diferentes tratamentos. Devido ao seu papel no crescimento celular, a grande maioria dos tecidos normais expressa grande quantidade da proteína PTEN. A perda da expressão da proteína PTEN foi observada em algumas malignidades associadas a anormalidades no gene PTEN. Essas anormalidades podem ser mono-paralelas (gliomas e carcinomas de mama, próstata, pulmão e cólon) ou bialélicas (carcinomas endometriais, próstata e câncer de mama ou glioblastoma multiforme). Existem também algumas doenças genéticas com alterações do tipo germinativo no gene PTEN como a síndrome de Cowden, síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, doença de Lhermitte-Duclos e um subgrupo de pacientes com síndrome de Proteus. Mutações somáticas de PTEN com perda de expressão proteica apresentam incidências variáveis, embora sejam frequentemente observadas em carcinomas endometriais esporádicos e em glioblastoma multiforme. Essas mutações geralmente estão relacionadas ao grau histológico do tumor e são consideradas fatores de mau prognóstico. A perda da expressão de PTEN é também um fator prognóstico nos tumores estromais gastrointestinais (GIST), tumores das glândulas salivares, colangiocarcinoma intra-hepático, carcinomas da vesícula biliar, etc. Além de ser um fator prognóstico, a imunocoloração do anticorpo PTEN atua como um indicador preditivo da resposta à terapia utilizando agentes quimioterápicos direcionados a alvos moleculares. Resultados controversos obtidos com o anticorpo PTEN estão aparentemente relacionados com o clone de anticorpo usado e / ou problemas de fixação de tecido. O único clone com resultados reproduzíveis no diagnóstico de amostras embebidas em parafina, especialmente em adenocarcinomas endometriais e suas lesões precursoras é o 6H2.1. No entanto, resultados superiores são sempre obtidos em amostras de biópsia excisional ou curetagem em comparação com imunomarcagem de amostras de histerectomia, onde a fixação é geralmente pior. Neste sentido e para mitigar a perda de imunocoloração, recomenda-se a utilização de seções seriadas recém-obtidas da amostra.

Armazenagem e estabilidade:

Armazenar entre 2°C e 8°C, porém o uso é feito em temperatura ambiente.

Conteúdo:

1. Ver frasco.

Notas técnicas importantes:

1. Evitar contato dos reagentes com os olhos e membranas mucosas. Caso os reagentes entrem em contato com áreas sensíveis lavar abundantemente com água.
2. Esse produto é prejudicial se ingerido.



3. Consulte as autoridades locais ou estaduais com relação ao método recomendado de descarte
4. Evitar a contaminação microbiana dos reagentes
5. Recomendado para uso em pesquisa (RUO)

Notas do protocolo:

A diluição ideal do anticorpo e protocolos para uma aplicação específica podem variar. Devido à sensibilidade superior destes reagentes exclusivos, os tempos de incubação recomendados não são aplicáveis a outros sistemas de detecção, pois os resultados podem variar. Os protocolos ideais para uma aplicação específica podem variar. Esses incluem, mas não estão limitados à fixação, método de recuperação de calor, tempos de incubação, diluição de anticorpos, espessura da secção de tecido. As recomendações e protocolos da literatura são baseados em uso exclusivo de produtos EasyPath. Em última análise, é responsabilidade do pesquisador para determinar as condições ideais. Este produto é apenas para uso profissional. A imuno-histoquímica é um processo de diagnóstico de múltiplas etapas que consiste em treinamento especializado na seleção dos reagentes apropriados, seleção de tecidos, fixação e em processamento, preparação da lâmina IHQ e interpretação do resultado de coloração. A utilização em tecido congelado não foi validado.

Protocolo:

- 1 - Desparafinização - Estufa 60-65 °C por 3 horas, depois bateria de Xilol e diluições decrescentes de álcool e lavar em água destilada
- 2 - Recuperação antigênica - Colocar 600ml de água destilada na câmara pressurizada (MuscaePlus/ EasyPath) e a(s) lâmina(s) no recipiente com tampão Citrato pH6 (Recomendado EP-12-20557/8 EasyPath), tampar a câmara e deixar 15 minutos em 110° C, conforme pré-programado, esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos no próprio tampão.
- 3 - Bloqueador de Peroxidase EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 4 - Anticorpo primário (Biocare ou EasyPath) por 30-60 minutos (Conforme padronização do laboratório), lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 5 - Amplificador do anticorpo EasyPath por 15 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 6 - Polímero PolyFusion-HRP EasyPath por 30 minutos, lavar com TBS e em seguida secar a lâmina com papel macio. Nota: O polímero é sensível à luz. Evitar a exposição desnecessária.
- 7 - Preparar o DAB EasyPath com 15 minutos de antecedência (Proporção: 1ml de DAB Substrato para 1 gota de DAB Cromógeno).
- 8 - DAB EasyPath por 5 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 9 - Potencializador do DAB EasyPath (etapa não obrigatória) por 2 minutos, lavar com TBS, depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 10 - Hematoxilina EasyPath por 1 minuto e lavar em água corrente por 1 minuto.
- 11 - Bateria de álcool e xilol.
- 12 - Montar a(s) lâmina(s).

INSTRUÇÕES GERAIS

Para a obtenção de um melhor resultado da metodologia e uma completa compreensão da terminologia utilizada, nós recomendamos as seguintes indicações:

Número de testes realizados *

O número mínimo de testes é calculado com 100µl gotas de reagente, aconselhamos seguir esta quantidade de reagentes. Em casos de seções pequenas, no entanto, pode-se utilizar menos.

Tempo de execução

O tempo de execução foi calculado somando-se a duração de todas as etapas do método. Ele não inclui o tempo de desparafinizar, hidratar e desidratar o corte.

Coloração final

A metodologia foi padronizada a uma temperatura média de 20°C e em condições normais de trabalho, utilizando-se os produtos indicados nesta literatura. Pode ocorrer uma pequena variação na coloração final, devido principalmente a variação da temperatura, ocorrendo esta variação, deve-se alterar o tempo utilizado em cada reagente, com o objetivo de intensificar ou diminuir a coloração.

Validade

Indica o tempo em que produto permanece inalterado a partir de sua fabricação, se armazenado adequadamente. Cada produto possui uma etiqueta com identificação do lote e data de vencimento.

Equipamento básico

Bandeja de incubação comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05022.



Câmara pressurizada MuscaePlus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Duas séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCENDENTE: para desparafinizar e levar os cortes das seções para água destilada, composta de: xilol (x2), etanol absoluto (x2), etanol a 96%, etanol a 70% e água destilada.
- ASCENDENTE: para desidratar e limpar, composta de: etanol a 70%, etanol a 96%, etanol absoluto (x2) e xilol (x2).

Aconselhamos o uso do meio de montagem ERV-MOUNT, comercializado pela Grupo Erviegas código EP-51-05042 frasco com 500ml e EP-51-05041 frasco com 100ml.

Equipamento complementar

Podem-se ser utilizadas micropipetas para reduzir a quantidade de reagentes utilizados durante o processo, bem como outros sistemas de recuperação antigênica como micro-ondas, panela de pressão, banho maria ou sistema automatizados para imuno-histoquímica como intelliPATH (Biocare).

Fixação e meios de inclusão

Os tempos dos métodos foram determinados a partir de cortes histológicos de fragmentos fixados em formol tamponado com pH 7 com tampão fosfato e inclusos em parafina, pelo tempo mínimo de fixação (Recomendado – Histofix, fixador EasyPath). A utilização de outros fixados nas práticas histológicas comuns (picromofomol de Bouin, B5), temperatura do processamento, inclusão e desparafinização podem interferir na metodologia e tempos de incubações.

Garantia Grupo Erviegas

O Grupo Erviegas garante o funcionamento do produto conforme especificado nesta literatura. Para mais informações sobre o produto ou detalhes sobre outras técnicas e produtos acesse nosso site www.grupoerviegas.com.br.

Referências Bibliográficas

1. Govender D, Chetty R. Gene of the month: PTEN. J Clin Pathol. 2012 Jul;65(7):601-603
2. Garg K, Broaddus RR, Soslow RA, Urbauer DL, Levine DA, Djordjevic B. Pathologic scoring of PTEN immunohistochemistry in endometrial carcinoma is highly reproducible. Int J Gynecol Pathol. 2012 Jan;31(1):48-56
3. Ettl T, Baader K, Stiegler C, Müller M, Agaimy A, Zenk J, Kühnel T, Gosau M, Zeitler K, Schwarz S, Brockhoff G. Loss of PTEN is associated with elevated EGFR and HER2 expression and worse prognosis in salivary gland cancer. Br J Cancer. 2012 Feb 14;106(4):719-726
5. Sangale Z, Prass C, Carlson A, Tikishvili E, Degrado J, Lanchbury J, Stone S. A robust immunohistochemical assay for detecting PTEN expression in human tumors. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2011 Mar;19(2):173-83.
6. <http://www.endometrium.org>