

CD44 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone SP37

Rabbit anti-human CD44 Monoclonal Antibody (Clone SP37)

Código	EP-12-50713	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	SP37
• Isotipo Ig	:	IgG
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético correspondente a região interna do CD44 humano.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Seção normal de pele, esôfago, urotélio ou tecido de amígdala.
• Marcação	:	Membrana

Aplicações conhecidas

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

Especificações:

A molécula CD44, também conhecida como molécula de adesão celular CAM-H ou CDw44, uma glicoproteína transmembrana de tipo I envolvida na adesão entre células e diferentes componentes da matriz extracelular e expressa num grande número de tecidos humanos. O gene que o codifica está localizado na região cromossômica 11p13 e contém pelo menos 21 exões, a partir dos quais, por um mecanismo de emendas, são geradas numerosas variantes (isoformas). Sua isoforma padrão (CD44s), que compreende os exons 1-5 e 16-20, está presente na maioria das células como uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 90 kDa que atua como principal ligante do ácido hialurônico, embora também possa interagir com outras moléculas estromais, tais como laminina, fibronectina, colágenos tipo I e IV, osteopontina e metaloproteínas de matriz. Devido à sua função de receptor de ácido hialurônico, a molécula de CD44, que é expressa em leucócitos, incluindo numerosas células T e B, timócitos, monócitos e granulócitos medulares, desempenha um papel importante na adesão de células com células e adesão de células da membrana basal, bem como na manutenção da polaridade celular. Como resultado, a proteína CD44s está envolvida na migração e ativação celular, incluindo o controle da biologia de vários tumores e sua capacidade de produzir metástases, bem como a recirculação de linfócitos B e T e o posicionamento em torno de seus territórios específicos, de modo que a expressão de CD44s é considerado característico de células B ativadas. Como uma glicoproteína de adesão, os CD44s são ubiquamente expressos na maioria dos epitélios protetores, exceto no epitélio biliar, músculo cardíaco, hepatócitos, células tubulares renais, plasmócitos, epitélio seminal e timo. Em tumores, a perda da expressão de CD44s é geralmente considerada como um fator prognóstico ruim que, na maioria dos casos, está associado à presença de metástases à distância. No entanto, altos níveis de CD44s em carcinoma de cólon tem sido relacionado a uma melhor resposta ao tratamento. Além disso, a determinação de CD44 pode ser útil no diagnóstico de lesões uroteliais malignas em seus estágios iniciais, caracterizada pela coloração exclusiva das camadas basais de células do epitélio transformado em comparação com a coloração difusa normalmente presente no urotélio normal.

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 EDTA 10X pH8,5 (Recomendado EP-12-20553/6 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 (piocromoformol 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. Cianfriglia M, Viora M, Tombesi M, Merendino N, Esposito G, Samoggia P, Forsberg UH, Schröder J. The gene encoding for MC56 determinant (drug-sensitivity marker) is located on the short arm of human chromosome 11. *Int J Cancer*. 1992 Oct 21;52(4):585-7
2. Katayama Y, Hidalgo A, Chang J, Peired A, Frenette PS. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*. 2005 Apr 18;201(8):1183-9
3. Sun X, Gong Y, Talamonti MS, Rao MS. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in carcinoid tumors. *Mod Pathol*. 2002 Dec;15(12):1333-8
4. Esteban F, Bravo JJ, González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Anticancer Res*. 2005 Mar-Apr;25(2A):1115-21
5. Karjalainen JM, Tammi RH, Tammi MI, Eskelinen MJ, Agren UM, Parkkinen JJ, Alhava EM, Kosma VM. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am J Pathol*. 2000 Sep;157(3):957-65
6. Combaret V, Gross N, Lasset C, Frappaz D, Peruisseau G, Philip T, Beck D, Favrot MC. Clinical relevance of CD44 cell-surface expression and N-myc gene amplification in a multicentric analysis of 121 pediatric neuroblastomas. *J Clin Oncol*. 1996 Jan;14(1):25-34
7. McKenney JK, Desai S, Cohen C, Amin MB. Discriminatory immunohistochemical staining of urothelial carcinoma in situ and non-neoplastic urothelium: an analysis of cytokeratin 20, p53, and CD44 antigens. *Am J Surg Pathol*. 2001 Aug;25(8):1074-8