

## CD63 - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Clone (NK1/C3)

Mouse anti-human CD63 Monoclonal Antibody (Clone NK1/C3)

Código	EP-12-50813	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	NK1/C3
• Isotipo Ig	:	IgG1/k
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético derivado de N-terminal do ACTH humano
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Pele normal, melanoma
• Marcação	:	Citoplasma e 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 CD63, também chamada de antígeno MLA1 ou ME491 associado ao melanoma, granulofisina ou glicoproteína 3 lisossômica associada à membrana (LAMP-3), é uma glicoproteína de 53 kDa pertencente à superfamília de proteínas transmembrana 4 ou tetraspaninas. É composto de 237 aminoácidos e é comumente expresso em células tumorais de melanoma, onde está associado a estágios iniciais da progressão do tumor. O gene ME491, que o codifica, localiza-se na região cromossômica 12q13.2 e a falta desta proteína foi observada na síndrome de Hermansky-Pudlak, que é caracterizada pela presença de lisossomas deficientes com grânulos densos e acúmulo de material ceróide em células do sistema reticuloendotelial. O gene ME491, que o codifica, localiza-se na região cromossômica 12q13.2 e a falta desta proteína foi observada na síndrome de Hermansky-Pudlak, que é caracterizada pela presença de lisossomas deficientes com grânulos densos e acúmulo de material ceróide em células do sistema reticuloendotelial. Funcionalmente, o CD63 desempenha um papel importante no transporte intracelular e é uma molécula necessária nos processos de tráfico que ocorrem no domínio luminal do PMEL, que são essenciais no desenvolvimento e maturação dos melanócitos. Similarmente, o CD63 é importante para a adesão de células endoteliais de leucócitos através da ativação pela P-selectina. Finalmente, o CD63 parece estar envolvido na degranulação dos mastócitos em resposta à sua ativação através da subunidade beta da cadeia épsilon do receptor de imunoglobulina de alta afinidade (sistema Ms4a2 / FcεRI). O antígeno CD63 é amplamente distribuído em tecidos normais, estando presente nos grânulos lisossomais das plaquetas, granulócitos neutrófilos e granulócitos basófilos, bem como em uma pequena proporção de células T inativas, células endoteliais e macrófagos. Nas células tumorais, o CD63 é expresso em nevos displásicos e melanomas em fase de crescimento radial, bem como em angiomiolipoma renal, neurotequetoma celular, fibroxantoma atípico e dermatofibrossarcoma protuberante, pápula fibrosa de células claras do nariz e tumor de células granulares não neurais da pele. Sua utilidade também tem sido comprovada no diagnóstico diferencial entre oncocitomas renais, que apresentam coloração apical, e carcinoma de células renais com citoplasma eosinofílico, que apresentam coloração citoplasmática difusa. Outros tumores, como os carcinomas de mama, carcinomas de células de Merkel, astrocitomas e adenocarcinomas de pulmão, também podem apresentar coloração positiva, sendo nos dois últimos casos um indicador de melhor prognóstico.

### 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 - Desparafinação - 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 desparafinar, 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 horizontal, comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05022.

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

Dois 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](http://www.grupoerviegas.com.br).

### Referências Bibliográficas

1. Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV, Ricciardi RP, Tsujimoto Y, Croce CM, Koprowski H. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* 1988 Jun 1;48(11):2955-62
2. Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N, Gerrard JM. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1775-82
3. Doyle EL, Ridger V, Ferraro F, Turmaine M, Saftig P, Cutler DF. CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood.* 2011 Oct 13;118(15):4265-73
4. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell.* 2011 Oct 18;21(4):708-21
5. Israels SJ, McMillan-Ward EM. Palmitoylation supports the association of tetraspanin CD63 with CD9 and integrin alphaIIb beta3 in activated platelets. *Thromb Res.* 2010 Feb;125(2):152-8
6. Mete O, Kilicaslan I, Gulluoglu MG, Uysal V. Can renal oncocytoma be differentiated from its renal mimics? The utility of anti-mitochondrial, caveolin 1, CD63 and cytokeratin 14 antibodies in the differential diagnosis. *Virchows Arch.* 2005 Dec;447(6):938-46
7. Kwon MS, Shin SH, Yim SH, Lee KY, Kang HM, Kim TM, Chung YJ. CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung. *Lung Cancer.* 2007 Jul;57(1):46-53
8. Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol.* 1998 Sep;153(3):973-83
9. Stone CH, Lee MW, Amin MB, Yaziji H, Gown AM, Ro JY, Têtu B, Paraf F, Zarbo RJ. Renal angiomyolipoma: further immunophenotypic characterization of an expanding morphologic spectrum. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jun;125(6):751-8
10. Page RN, King R, Mihm MC Jr, Googe PB. Microphthalmia transcription factor and NKI/C3 expression in cellular neurothekeoma. *Mod Pathol.* 2004 Feb;17(2):230-4
11. Ma CK, Zarbo RJ, Gown AM. Immunohistochemical characterization of atypical fibroxanthoma and dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Clin Pathol.* 1992 Apr;97(4):478-83
12. Lee AN, Stein SL, Cohen LM. Clear cell fibrous papule with NKI/C3 expression: clinical and histologic features in six cases. *Am J Dermatopathol.* 2005 Aug;27(4):296-300
13. Lazar AJ, Fletcher CD. Primitive nonneural granular cell tumors of skin: clinicopathologic analysis of