

Citoqueratina 5/6 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (EP67+EP24)

Rabbit anti-human Cytokeratin 5/6 Monoclonal Antibody (Clone EP67+EP24)

Código	EP-12-51203	1ml	1:50 – 1:100	Concentrado
	EP-12-51201	0.1ml	1:50 – 1:100	Concentrado
	EP-12-51204	1ml	Diluído	Pronto para uso
	EP-12-51206	6ml	Diluído	Pronto para uso

- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : EP67+EP24³
- Isotipo Ig : Coelho IgG
- Imunógeno : Peptídeo sintético correspondente a resíduos próximos ao terminal-C das citoqueratinas humanas 5 e 6, respectivamente.
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Próstata ou Amígdala
- Marcação : Citoplasma e Membrana celular

Aplicações conhecidas

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

Especificações:

As queratinas são proteínas do filamento intermediário citoplasmático expressas pelas células epiteliais. CK5 é uma citoqueratina tipo II. Mutações de perda de função no gene da queratina 5 (KRT5) afetaram membros da família e em seis pacientes não relacionados com a doença de Dowling-Degos (DDD), uma genodermatose autossômica dominante. Isso sugere um papel crucial para as ceratinas na organização da adesão celular, na absorção de melanossomos, no transporte de organelas e na ancoragem nuclear. A CK5 rotula as células mioepiteliais das células basais da mama e da próstata. A CK5 e a calretinina têm sido úteis em diferentes estudos como marcadores imuno-histoquímicos sugestivos de mesotelioma, e sua expressão é analisada quanto à diferenciação histológica com adenocarcinomas, especialmente quando confrontados com tumores metastáticos de origem desconhecida. A citoqueratina 6 humana do tipo II (CK6; 56 kDa) é bem conhecida por sua forte indução em epitélios estratificados que apresentam uma taxa aumentada de proliferação celular ou diferenciação anormal durante a cicatrização de feridas em várias doenças (por exemplo psoríase, queratose actínica) e câncer. A CK6 é expressa em epitélios estratificados, incluindo mucosa oral, esôfago, camada basal da epiderme, a bainha radicular externa dos folículos pilosos e nos epitélios glandulares. A CK6 é um marcador de queratinócitos hiperproliferativos e ativados encontrados na psoríase. O anti-CK6 emparelhado com o anticorpo CK5 é útil para diferenciar o mesotelioma (positivo) do carcinoma pulmonar (negativo) ou o carcinoma metastático (negativo) na pleura. Um anticorpo contra CK5 / 6 também tem sido usado para distinguir a hiperplasia ductal usual da mama (coloração forte) do DCIS sólido papilar (negativo).

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 investigador 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 IHC 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 (Muscae Plus / 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 lavar 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. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31:11-24, (1982).
2. Ansai S; Katagata Y; Yoshikawa K; Hashimoto H; Hozumi Y; Kondo S; Aso K. An immunohistochemical study of sebaceous carcinoma with anti-keratin monoclonal antibodies: comparison with other skin cancers. *Journal of Dermatology*. 21(8):553-9 (1994).
3. Alsanjari N, Lynch MJ, Fisher C, Parkinson MC. Vesical clear cell adenocarcinoma. V. Nephrogenic adenoma: a diagnostic problem. *Histopathology*, 27(1):43-9 (1995).
4. Heatley M, Maxwell P, Whiteside C, Toner P. Cytokeratin intermediate filament expression in benign and malignant breast disease. *Journal of Clinical Pathology*, 48(1):26-32 (1995).
5. Mooi WJ, Deenik W, Peterse JL, Hogendoorn PC. Keratin immunoreactivity in melanoma of soft parts (clear cell sarcoma). *Histopathology*, 27(1):61-5 (1995).
6. Nouri AM, Hussain RF, Oliver RT. Epidermal growth factor-induced protection of tumour cell susceptibility to cytolysis. *European Journal of Cancer*, 31A(6):963-9 (1995).
7. Ogden GR, Chisholm DM, Green M, Cowpe JG, Lane EB. Influence of temperature on long-term keratin immunoreactivity for oral exfoliative cytology. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 17(1):35-8 (1995).
8. Ramnarain ND, Walker NP, Markey AC. Basal cell carcinoma: rapid techniques using cytokeratin markers to assist treatment by micrographic (Mohs') surgery. *British Journal of Biomedical Science*, 52(3):184-7 (1995).
9. Chu PG, Weiss LM: Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 40, 403-439 (2002).