

TCR C GAMA – Anticorpo Monoclonal anti-humano – (Clone H-41)

Mouse Anti-TCR Monoclonal Antibody range (Clone H-41)

Código	EP-12-52003	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	H-41
• Isotipo Ig	:	IgG1 _k
• Imunógeno	:	Proteína recombinante de origem humana TCR
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Seção de tecido da amígdala
• 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:

O receptor de linfócitos T (TCR) é um complexo polimérico formado por 2 glicoproteínas de ligação ao ligante contendo regiões variáveis (heterodímeros $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ do TCR) e expressas na superfície dos linfócitos T em associação com a molécula CD3 formada por duas cadeias γ e δ juntamente com outros dois ϵ . É geralmente aceito que os heterodímeros $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ dos receptores TCR são mutuamente exclusivos e delimitam subpopulações de linfócitos T com funções e localizações muito diferentes no organismo. A função da molécula de TCR através de suas porções variáveis é se ligar ao antígeno e, juntamente com as principais moléculas de histocompatibilidade, produzir a ativação celular imune.

Os dímeros que compõem o receptor TCR têm uma estrutura característica que consiste em dois polipeptídeos transmembrana ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) ligados covalentemente por pontes dissulfúricas nas quais três zonas diferentes são diferenciadas: uma porção extracelular de amino N-terminal, um amino transmembrana e uma cauda carboxilo citoplásmico ou C-terminal. Do mesmo modo, o domínio extracelular de cada polipeptídeo possui uma região variável ou V de ligação ao antígeno localizado na extremidade do terminal N e uma porção constante ou C adjacente à membrana nuclear. As variáveis destas células, por sua vez, formam contries curtas onde variam da seqüência de aminoácidos em ambas a mimas para formar trêz regis determinantes de complementaridade (regis CDR) que permitem o reconhecimento durante a resposta imunitária.

Semelhante ao que acontece durante a síntese de cadeias pesadas e leves de imunoglobulinas, as regiões variáveis das cadeias receptoras de TCR estão contidas em múltiplos segmentos dos genes V, D e J que, ao longo do processo de maturação linfóides, são submetidos a vários rearranjos somáticos e processos de adição de nucleotídeos para gerar a diversidade necessária para o reconhecimento de antígenos. As regiões constantes das cadeias $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ estão ligados covalentemente por pontes de dissulfureto, que portador de péptidos contendo cisteína de modo que em humanos e no caso da cadeia gama este aminoácido CY2 podem estar ausentes ou, pelo contrário, ser duplicados ou triplicados dando origem a cadeias γ com diferentes massas moleculares. Os resíduos trans membranares das cadeias $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ interagem com aqueles das porções correspondentes das cadeias CD3 com aqueles que formam o complexo TCR para produzir o sinal de ativação imunológica. Em contraste, as caudas intracitoplasmáticas do receptor de TCR não participam da transdução do sinal.

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 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 desparafinação 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. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):88-100.
2. Jaffe ES, Nicolae A, Pittaluga S. Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas in the WHO classification: pearls and pitfalls. *Mod Pathol*. 2013 Jan;26 Suppl 1:S71-87.
3. Rodríguez-Pinilla SM, Ortiz-Romero PL, Monsalvez V, Tomás IE, Almagro M, Sevilla A, Camacho G, Longo MI, Pulpillo Á, Diaz-Pérez JA, Montes-Moreno S, Castro Y, Echevarría B, Trébol I, Gonzalez C, Sánchez L, Otín AP, Requena L, Rodríguez-Peralto JL, Cerroni L, Piris MÁ. TCR- γ expression in primary cutaneous T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):375-84
4. Wilson AL, Swerdlow SH, Przybylski GK, Surti U, Choi JK, Campo E, Trucco MM, Van Oss SB, Felgar RE. Intestinal $\gamma\delta$ T-cell lymphomas are most frequently of type II enteropathy-associated T-cell type. *Hum Pathol*. 2013 Jun;44(6):1131-45
5. Garcia-Herrera A, Song JY, Chuang SS, Villamor N, Colomo L, Pittaluga S, Alvaro T, Rozman M, de Anda Gonzalez J, Arrunategui AM, Fernandez E, Gonzalvo E, Estrach T, Colomer D, Raffeld M, Gaulard P, Campo E, Jaffe ES, Martinez A. Nonhepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphomas represent a spectrum of aggressive cytotoxic T-cell lymphomas with a mainly extranodal presentation. *Am J Surg Pathol*. 2011 Aug;35(8):1214-25

