

Osteocalcina – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (C-8)

Mouse anti-human Osteocalcin Monoclonal Antibody (Clone C-8)

Código EP-12-52283 **1ml** **1:50** **Concentrado**

- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : C-8
- Isotipo Ig : Camundongo IgG2a
- Imunógeno : Epítipo localizado entre os aminoácidos 1-100 da proteína total de a
 - osteocalcina de origem humano.
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Osso
- Marcação : Citoplasma 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:

A osteocalcina ou BGLAP é uma proteína com uma estrutura muito preservada, diferente do colagénio, composta apenas por uma cadeia de 46-50 aminoácidos que contém três resíduos de gama-glutamil carboxilase dependente de vitamina K. Em humanos, é sintetizado quase exclusivamente por osteoblastos. Portanto, é muito abundante no tecido ósseo e na dentina, onde desempenha importantes funções na mineralização e na homeostase do cálcio. No momento da deposição mineral no osso embrionário, a osteocalcina liga-se ao cálcio dependente da hidroxiapatita e desempenha importante papel na sua organização histológica. A osteocalcina é codificada pelo gene BGLAP, localizado na região cromossômica 1q22, cujas alterações mutantes estão associadas a algumas formas de condrodistrofia congênita (condrodysplasia punctata), algumas falhas de coagulação e embriopatia cumarínica. Algumas variações genéticas no locus da osteocalcina afetam a densidade mineral dos ossos em mulheres na pós-menopausa, o que as torna propensas a osteoporose. A expressão da osteocalcina em células osteoformadas maduras e imaturas confere-lhes utilidade diagnóstica em tumores ósseos. Dentro da categoria de tumores ósseos, a perda de intensidade em sua coloração parece estar correlacionada com um aumento do grau de malignidade da neoplasia. Da mesma forma, em osteossarcomas condroblásticos, os condrócitos tumorais também expressam esse marcador, bem como a maioria das células fusiformes do osteossarcoma fibroblástico e do agressivo tumor de células gigantes do osso. Além disso, os condroblastomas e a doença de Paget são positivos para essa proteína. Em contraste, tumores benignos de células gigantes e cistos de aneurisma são negativos, tornando a osteocalcina uma ferramenta útil no diagnóstico dessas lesões. Além disso, a detecção sérica de osteocalcina é uma ferramenta útil no diagnóstico e acompanhamento de tumores ósseos metastáticos. Embora o RNA da osteocalcina esteja presente no epitélio da próstata, sua expressão proteica só pode ser confirmada nas metástases ósseas de adenocarcinomas derivados delas, embora os resultados da literatura sejam contraditórios, pois dependem do desenho do estudo e do clone utilizado. No câncer de próstata, não foi detectada correlação entre os níveis de expressão pré e pós-hormônio e o prognóstico da lesão.

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 seção 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.

Referencias Bibliográficas

1. El-Badawi ZH, Muhammad EM, Noaman HH. Role of immunohistochemical cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and osteocalcin in differentiating between osteblastomas and osteosarcomas. *Malays J Pathol.* 2012 Jun;34(1):15-23
2. Gardner TA, Lee SJ, Lee SD, Li X, Shirakawa T, Kwon DD, Park RY, Ahn KY, Jung C. Differential expression of osteocalcin during the metastatic progression of prostate cancer. *Oncol Rep.* 2009 Apr;21(4):903-8
3. Ou YC, Chen JT, Yang CR, Ko JL, Hsieh YS, Kao C. Expression of osteocalcin in prostate cancer before and after hormonal therapy. *Anticancer Res.* 2003 Sep-Oct;23(5A):3807-11
4. Park YK, Yang MH, Kim YW, Park HR. Osteocalcin expression in primary bone tumors—in situ hybridization and immunohistochemical study. *JKorean Med Sci.* 1995 Aug;10(4):263-8