

Coquetel PIN - Anticorpo anti-humano Clone (13H4+4A4)

Rabbit/Mouse anti-human Cocktail (PIN Cocktail) (Clones 13H4+4A4)

Código	EP-12-52553	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	13H4+4A4
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG + Camundongo IgG2a
• Imunógeno	:	Polipéptido AMACR humano + aminoácidos 1-250 da porção N-terminal da proteína p63 humana.
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Próstata
• Marcação	:	Citoplasma de células granulares (AMACR) e nuclear (p63).

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 principal uso da combinação de ambos os anticorpos em um único reagente é a imunomarcagem simultânea das glândulas prostáticas, a fim de detectar se é ou não neoplásica. No caso do adenocarcinoma da próstata, as glândulas neoplásicas apresentam coloração citoplasmática produzida pela expressão de p504s e ausência de coloração nuclear, uma vez que estas glândulas não possuem células basais p63 positivas. Glândulas normais ou hiperplásicas devem apresentar coloração nuclear na camada basal. Devido ao padrão diferente de coloração dos anticorpos incluídos no coquetel, a detecção pode ser realizada com sistemas de detecção de HRP polivalentes. No entanto, como os anticorpos são desenvolvidos em dois hospedeiros diferentes, um sistema de detecção duplo pode ser usado.

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.

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 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. Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, Sjostrom B, Dahlqvist A, Coates PJ. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol.* 198: 417-427. 2002.
2. Evans AJ. Alpha-methylacyl CoA racemase (p504s): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies. *J Clin Pathol.* 56: 892-897. 2003.
3. Jiang Z, Fanger GR, Woda BA, Banner BF, Algate P, Dresser K, Xu J, Chu PG. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (p504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. *Hum Pathol.* 34: 792-796. 2003.
4. Reis-Filho JS, Simpson PT, Martins A, Preto A, Gartner F, Schmitt FC. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.* 443:122-132. 2003.
5. Langner C, Ratschek M, Tsybrovskyy O, Schips L, Zigeuner R. P63 immunoreactivity distinguishes upper urinary tract transitional-cell carcinoma and renal-cell carcinoma even in poorly differentiated tumors. *J Histochem Cytochem.* 51:1097-1099. 2003.
6. Bilal H, Handra-Luca A, Bertrand JC, Fouret PJ. P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of human normal and tumor salivary gland tissues. *J Histochem Cytochem.* 51:133-139. 2003.
7. Zhou M, Aydin H, Kanane H, Epstein JI. How often does alpha-methylacyl-CoA-racemase contribute to resolving an atypical diagnosis on prostate needle biopsy beyond that provided by basal cell markers? *Am J Surg Pathol.* 28: 239-243. 2004.
8. Skinnider BF, Oliva E, Young RH, Amin MB. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (p504s) in nephrogenic adenoma: a significant immunohistochemical pitfall compounding the differential diagnosis with prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 28: 701-705. 2004.
9. Tretiakova MS, Sahoo S, Takahashi M, Turkyilmaz M, Vogelzang NJ, Lin F, Krausz T, Teh BT, Yang XJ. Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase in papillary renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 28: 69-76. 2004.
10. Molinie V, Fromont G, Sibony M, Vieillefond A, Vassiliu V, Cochand-Priollet B, Herve JM, Leuret T, Baglin AC. Diagnostic utility of a p63/alpha-methyl-CoA-racemase (p504s) cocktail in atypical foci in the prostate. *Mod Pathol.* 17:1180-1190. 2004.
11. Westfall MD, Pietenpol JA. p63: Molecular complexity in development and cancer. *Carcinogenesis.* 25: 857-864. 2004.
12. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 35: 15-25. 2011.