

Podoplanina – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (D2-40)

Mouse anti-human Podoplanin Monoclonal Antibody (Clone D2-40)

Código	EP-12-52603	1ml	1:40 – 1:150	Concentrado
	EP-12-52601	0.1ml	1:40 – 1:150	Concentrado
	EP-12-52606	6ml	Diluído	Pronto para uso

- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : D2-40
- Isotipo Ig : Camundongo IgG1
- Imunógeno : Peptídeo sintético semelhante à molécula M2A humana.
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : 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:

D2-40 reconhece o antígeno M2A codificado pelo gene Prox1 localizado na região cromossômica 1q32.2-q32.3. Consiste em uma sialoglicoproteína de 40 kDa, contendo estrutura de carboidratos do tipo mucina necessária para preservar a antigenicidade dessa molécula. A M2A é expressa em vasos linfáticos e está ausente no endotélio vascular venoso e arterial. Outros tecidos normais que expressam a Podoplanina são células mioepiteliais, células mesoteliais, células dendríticas, células dos ductos biliares, osteócitos, condrócitos, células da granulosa, células basais do epitélio escamoso, etc. É expresso em vários tipos de tumores vasculares, seminomas e, até certo ponto, carcinomas embrionários, mesoteliomas, hemangioblastomas, schwannomas, dermatofibromas, trico-blastomas etc.

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 (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 Muscae Plus (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.

Referências Bibliográficas

1. Min KH, Park SJ, Lee KS, Hwang SH, Kim SR, Moon H, Han HJ, Chung MJ, Lee YC. Clinical usefulness of D2-40 in non-small cell lung cancer. *Lung*. 2011 Feb;189(1):57-63.
2. Kalof AN, Cooper K. D2-40 immunohistochemistry--so far! *Adv Anat Pathol*. 2009 Jan;16(1):62-4.
3. Bandarchi B, Ma L, Marginean C, Hafezi S, Zubovits J, Rasty G. D2-40, a novel immunohistochemical marker in differentiating dermatofibroma from dermatofibrosarcoma protuberans. *Mod Pathol*. 2010 Mar;23(3):434-8.
4. Sonne SB, Herlihy AS, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Almstrup K, Skakkebaek NE, Marks A, Leffers H, Rajpert-De Meyts E. Identity of M2A (D2-40) antigen and gp36 (Aggrus, T1A-2, podoplanin) in human developing testis, testicular carcinoma in situ and germ-cell tumours. *Virchows Arch*. 2006 Aug;449(2):200-6.
5. Plaza JA, Ortega PF, Bengana C, Stockman DL, Suster S. Immunolabeling pattern of podoplanin (d2-40) may distinguish basal cell carcinomas from trichoepitheliomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 cases. *Am J Dermatopathol*. 2010 Oct;32(7):683-7.
6. Chekol SS, Sun CC. Malignant mesothelioma of the tunica vaginalis testis: diagnostic studies and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2012 Jan;136(1):113-7.
7. Yu H, Gibson JA, Pinkus GS, Hornick JL. Podoplanin (D2-40) is a novel marker for follicular dendritic cell tumors. *Am J Clin Pathol*. 2007 Nov;128(5):776-82.
8. Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006 Mar;13(2):83-8.