

Anticorpo Monoclonal Anti-humano Trombomodulina - (Clone EP175)

Rabbit anti-human Thrombomodulin Monoclonal Antibody (Clone EP175)

Código	EP-12-53033	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	EP175 ³
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético correspondente a resíduos no terminal C da proteína trombomodulina humana.
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Urotélio normal
• Marcação	:	Membrana celular e citoplasma

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 trombomodulina (TM) é uma glicoproteína transmembrana de massa molecular de 75 kDa com seis domínios repetidos homólogos ao fator de crescimento epidérmico e um domínio terminal homólogo às proteínas semelhantes à lectina.

A trombomodulina ativa proteínas anticoagulantes derivadas da vitamina K sintetizada no fígado (proteínas C e S) que se ligam à trombina para impedir a formação de trombos na superfície endotelial do vaso. A expressão de TM é regulada positivamente por agentes que aumentam o AMPc e regulam negativamente através da interleucina I, fator de necrose tumoral (TNF) e algumas endotoxinas. A MT se liga aos domínios 4 e 6 do fator de crescimento epidérmico, a menor região que se liga à trombina. Esta ligação pode interferir com a ligação entre a trombina e a trombomodulina.

Este anticorpo produziu imunocoloração numa variedade de células normais: vasos sanguíneos e células linfáticas do revestimento endotelial, células mesoteliais, urotélio normal, alguns macrófagos alveolares pulmonares, revestimento de células meníngeas, sinoviócitos, sinciotrofoblastos, megacariócitos e plaquetas. A trombomodulina também é encontrada em algum subtipo de ilhotas pancreáticas e em nervos periféricos. É diagnosticamente útil em células neoplásicas de tumores vasculares, carcinomas uroteliais, meningiomas, tumor adenomatóide, coriocarcinoma e tumores pleurais. TM pode ser usado para diagnóstico diferencial entre mesotelioma (positivo) e adenocarcinoma pulmonar (consistentemente negativo). A expressão fraca da MT foi demonstrada em dois terços dos casos examinados, enquanto uma forte coloração da MT foi revelada em um terço dos cânceros do cólon.

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. Fink LM, Eidt JF, Johnson K, Cook JM, Cook CD, Morser J, Marlar R, Collins CL, Schaefer R, Xie SS. Thrombomodulin activity and localization. *Int J Develop Biol*; 37: 221-226. 1993.
2. Collins CL, Ordonez NG, Schaefer R, Cook CD, Xie SS, Granger J, Hsu PL, Fink L, Hsu SM. Thrombomodulin expression in malignant pleural mesothelioma and pulmonary adenocarcinoma. *Am J Pathol*; 141(4): 827-833. 1992.
3. Ordóñez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lungadenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*; 27(8): 1031-1051. 2003.
4. King JE, Thatcher N, Pickering CA, Hasleton PS. Sensitivity and specificity of immunohistochemical markers used in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a detailed systematic analysis using published data. *Histopathology*; 48(3): 223-232. 2006.
5. Minato H, Nojima T, Kurose N, Kinoshita E. Adenomatoid tumor of the pleura. *Pathol Int*; 59(8): 567-571. 2009.
6. Sierko E, Wojtukiewicz MZ, Zawadzki R, Zimnoch L, Kisiel W. Expression of protein C (PC), protein S (PS) and thrombomodulin (TM) in human colorectal cancer. *Thromb Res*; 125(3): e71-75. 2010.

