

MITF – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Fator de Transcrição Associado à Microftalmia – Cone (C5+D5)

Mouse anti-human MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) - Monoclonal Antibody (Clone C5+D5)

Código	EP-12-52023	1ml
• Diluição recomendada	:	1:20
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	C5 + D5
• Isotipo Ig	:	Camundongo IgG1/Kappa + IgG1/Kappa.
• Imunógeno	:	-
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Melanoma maligno ou melanócitos da pele.
• Marcação	:	Nuclear

Aplicações conhecidas

Em Imuno-histoquímica (IHQ) para uso em tecidos embebidos em parafina. Não testado em tecidos congelados e técnicas de western-blotting.

Especificações:

Este anticorpo reage com o fator de transcrição da microftalmia humana (MITF). O gene MITF (fator de transcrição da microftalmia) codifica um fator nuclear de transcrição helix-loop-helix envolvido na pigmentação e no desenvolvimento de mastócitos e células ósseas. O gene MITF é essencial para o desenvolvimento normal dos melanócitos e é responsável pela regulação da expressão de outros genes relacionados à linhagem melanocítica: genes de tirosinase, SILV / PMEL1 / GP100 (codificando HMB45), MLANA / MART1 (codificando para Melan A), TRP-1 e TRP-2. A mutação do gene MITF em humanos causa síndrome de Waardenburg IIA e síndrome de Tietz, caracterizada por distúrbios de pigmentação e surdez, este último devido à deficiência de melanócitos na orelha interna. Existem duas isoformas conhecidas de MITF que diferem em 66 resíduos de aminoácidos do terminal-amino. A isoforma mais curta da MITF é específica dos melanócitos. O MITF-M é expresso em melanócitos normais e malignos. As outras isoformas, MITF-A, MITF-C e MITF-H, diferem estruturalmente de MITF-M no terminal amino e são expressas em osteoclastos, mastócitos e células cardíacas, e em linhas celulares de melanoma B16 (embora não em outras linhas celulares de melanoma). O anticorpo anti-MITF reage contra as isoformas melanocíticas e não melanocíticas do gene MITF e, embora não distinga entre lesões melanocíticas benignas e malignas, apresenta alta sensibilidade e especificidade como marcador histopatológico de melanócitos e neoplasias derivadas de melanócitos (melanomas). Utilizando MITF e Melan A no mesmo painel de marcadores de melanoma, os valores de sensibilidade (95%) e especificidade (100%) obtidos são superiores aos obtidos com a proteína S100 e HMB45, mesmo em amostras citológicas. MITF, Melan-A e tirosinase são marcadores sensíveis para o diagnóstico de melanomas epitelióides. Níveis baixos de Melan-A e MITF mostraram correlação com pior prognóstico. A MITF demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para detectar malignidades invasivas de origem melanocítica e estudar os linfonodos sentinela.

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.

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.

Referências Bibliográficas

1. Tassabehji M, Newton VE, Read AP: Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet.* 8:251-255 (1994).
2. Watanabe A, Takeda K, Ploplis B, et al. *Nature Genetics* 18:283-286 (1998).
3. Amiel J, Watkin PM, Tassabehji M, Read AP, Winter RM: Mutation of the MITF gene in albinism-deafness syndrome (Tietz syndrome). *Clin Dysmorphol.* 7:17-20 (1998).
4. Weilbaecher KN, et al. *J. Exp. Med.*, 187:775-785 (1998).
5. Hemesath P, et al. *Nature.* 391:298-301 (1998).
6. King R, Weilbaecher K N, McGill G, et al. *American Journal of Pathology* 155 (3): 731-738 (1999).
7. Smith SD, Kelley PM, Kenyon JB, Hoover D: Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. *J Med Genet.* 37:446-448 (2000).
8. O'Reilly FM, Brat DJ, McAlpine BE, Grossniklaus HE, Folpe AL, Arbiser JL. Microphthalmia transcription factor immunohistochemistry: a useful diagnostic marker in the diagnosis and detection of cutaneous melanoma, sentinel lymph node metastases, and extracutaneous melanocytic neoplasms. *J Am Acad Dermatol.* 45: 414-419 (2001).
9. Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC, Weilbaecher KN, Eltoum IA, Siegal GP, Fisher DE, Chhieng DC. Comparison of five antibodies as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations. *Am J Clin Pathol.* 118: 930-936 (2002).
10. Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE. MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 Are Transcriptionally Regulated by MITF in Melanocytes and Melanoma. *American Journal of Pathology.* 163: 333-343 (2003).