

LEF1 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Fator Linfócito de Ligação ao Potenciador

Rabbit anti-human LEF1 (Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1) Monoclonal Antibody (Clone EP310)

Código	EP-12-51893	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	EP310 ³
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético correspondente a resíduos em humanos LEF1.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Amígdala
• 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:

LEF1 é uma proteína nuclear de 42 kDa de peso molecular que é codificada pelo gene LEF1 localizado na região cromossômica 4q25. Pertence a uma família de proteínas reguladoras que compartilham homologia estrutural com proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG1). A LEF1 é expressa em linfócitos pré-B e pré-T, onde, através da via de sinalização Wnt, atua como um fator essencial de transcrição para a proliferação e sobrevivência dessas células. As ativações da via Wnt levam ao acúmulo de β -catenina e, eventualmente, à transcrição gênica envolvida na sobrevivência e no ciclo celular. A ativação sustentada com superexpressão de LEF1, como ocorre na leucemia linfóide crônica, tem comprovadamente importante papel na carcinogênese molecular, onde sua inibição em modelos animais experimentais leva à apoptose das células neoplásicas. Em tecidos linfóides normais, observa-se que a coloração nuclear de LEF1 é predominante nas células T das regiões paracorticais sem ser detectada nas células B, onde sua diferenciação em relação aos elementos maduros e plasmócitos é acompanhada pela perda da expressão de LEF1. Nas neoplasias linfóides, a presença de mais de 10% de células tumorais coradas é considerada como positiva e o LEF1 é um marcador com alta especificidade para o diagnóstico de leucemia linfóide crônica (LLC) / linfoma linfocítico pequeno, incluindo tanto o CD5 positivo quanto o CD5 negativo casos, se a morfologia celular for concordante. A coloração de LEF1 está em correlação direta com a expressão de ZAP70 e implica um prognóstico mais favorável para a neoplasia sem observar correlação com a expressão de CD38, a deleção de p53 ou a trissomia 12. No entanto, e em provável relação com a sensibilidade e especificidade dos métodos e anticorpos utilizados para a detecção de LEF1, em outros linfomas, resultados positivos e variáveis foram obtidos, de modo que o anticorpo tem coloração focal em até 50% do alto grau linfomas foliculares e 40% dos linfomas difusos de grandes células B, dos quais 18% estão associados à transformação de LLC na síndrome de Richter. Neste último caso, a coloração é geralmente mais intensa nas áreas com mais atipia. Embora a maioria das publicações confirme a negatividade dos linfomas de células marginais e da *cornija*, estudos mais recentes comprovaram a coloração focal em casos isolados. Além disso, e como o LEF1 oferece coloração simultânea nos linfócitos T reativos, muitas vezes aprisionados dentro do processo proliferativo clonal, a correlação da coloração de LEF1 com outro marcador T como CD3, bem como outros marcadores específicos, é muito aconselhável. A expressão de LEF1 em outras neoplasias, como adenocarcinomas do cólon ou pancreático, foi mencionada em estudos isolados.

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 coloração horizontal, comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05021.

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 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. Tandon B, Peterson L, Gao J, Nelson B, Ma S, Rosen S, Chen YH. Nuclear overexpression of lymphoid-enhancerbinding factor 1 identifies chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma in small B-cell lymphomas. *Mod Pathol*. 2011 Nov;24(11):1433-43
2. Gutierrez A Jr, Tschumper RC, Wu X, Shanafelt TD, Eckel-Passow J, Huddleston PM 3rd, Slager SL, Kay NE, Jelinek DF. LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood*. 2010 Oct 21;116(16):2975-83
3. Zhang XM, Aguilera N. New immunohistochemistry for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Dec;138(12):1666-72
4. Menter T, Dirnhofer S, Tzankov A. LEF1: a highly specific marker for the diagnosis of chronic lymphocytic B cell leukaemia/small lymphocytic B cell lymphoma. *J Clin Pathol*. 2015 Jun;68(6):473-8
5. Singhi AD, Lilo M, Hruban RH, Cressman KL, Fuhrer K, Seethala RR. Overexpression of lymphoid enhancerbinding factor 1 (LEF1) in solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas. *Mod Pathol*. 2014 Oct;27(10):1355-63