

WT-1 – Anti-humano WT-1 (Wilm’s Tumour Protein1) Anticorpo Monoclonal (Clone 6F-H2)

Mouse anti-human WT-1 (Wilm’s Tumour Protein 1) Monoclonal Antibody (Clone 6F-H2)

Código	EP-12-53223	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	6F-H2
• Isotipo Ig	:	Camundongo IgG1 / k
• Imunógeno	:	Proteína WT1 humana truncada correspondente ao AA 1-181
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Trompa de Falópio, mesotélio, tumor de Wilm ou carcinoma seroso do ovário
• 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:

O gene WT-1 está localizado no cromossomo 11p13 e está envolvido no desenvolvimento do tumor de Wilm (WT). O WT está associado a mutações do WT1, um fator de transcrição do dedo de zinco que é essencial para o desenvolvimento do rim metanéfrico e do sistema urogenital. O gene WT1 é normalmente expresso

em rim e mesotélio fetais, e sua expressão tem sido sugerida como marcador para tumor de Wilms e mesotelioma.

O anti-WT1 é útil no diagnóstico de mesoteliomas malignos (núcleos), enquanto os núcleos dos adenocarcinomas pulmonares não são rotulados com este produto. No entanto, a marcação citoplasmática dos adenocarcinomas pulmonares pode ser observada. O Anti-WT1 marca 93% dos carcinomas ovarianos serosos e 0% (núcleos) dos carcinomas mucinosos dos ovários e dos carcinomas pâncreas-biliares. O anti-WT1 também pode ser utilizado no diagnóstico diferencial de pequenos tumores de células redondas como 100% dos tumores redondos de pequenas células desmoplásicas e 70% nefroblastomas (tumor de Wilm) são positivos (núcleos) para este marcador. Tumores como o sarcoma de Ewings / PNET, neuroblastomas, rabdomyosarcomas e rabdoides tumores são negativos. Ocasionalmente, a marcação citoplasmática pode ser vista nesses tumores.

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 - Desparafinação - 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 desparafinar, 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 desparafinar 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. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*; 273: 141–161. 2001.
2. Nakatsuka SI, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, Kawano K, Kuwae Y, Yamauchi A, Okumura M, Kitamura Y, Oka Y, Kawasel, Sugiyama H, Aozasa K. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern Pathology* 19: 804–814, 2006.
3. Foster MR, Johnson JE, Olson SJ, et al. Immunohistochemical analysis of nuclear vs cytoplasmic staining of WT1 in malignant mesotheliomas and primary pulmonary adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med*; 125:1316–1320. 2001.
4. Carpentieri DF, Nichols K, Chou PM, Matthews M, Pawel B, Huff D. The expression of WT1 in the differentiation of rhabdomyosarcoma from other pediatric small round blue cell tumors. *Mod Pathol*. 2002 Oct;15(10):1080-6.
5. Goldstein NS, Uzieblo A. WT1 immunoreactivity in uterine papillary serous carcinomas is different from ovarian serous carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2002 Apr;117(4):541-5.
6. Hill DA, Pfeifer JD, Marley EF, Dehner LP, Humphrey PA, Zhu X, Swanson PE. WT1 staining reliably differentiates desmoplastic small round cell tumor from Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. An immunohistochemical and molecular diagnostic study. *Am J Clin Pathol*. 2000 Sep;114(3):345-53.
7. Waldstrom M, Grove A. Immunohistochemical expression of Wilm's tumor gene protein in different histologic subtypes of ovarian carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 2005 Jan;129(1):85-8.
8. Arnold MA, Schoenfeld L, Limketkai BN, Arnold CA. Diagnostic pitfalls of differentiating desmoplastic small round cell tumor (DSRCT) from Wilms tumor (WT): overlapping morphologic and immunohistochemical features. *Am J Surg Pathol* 2014 Sep;38(9):1220-6.