

## PRAME 1 – Anticorpo Monoclonal – Clone (EPR20330)

Rabbit-anti-human PRAME 1 – Monoclonal Antibody

Códigos	EP-12-53311	0,1 mL	concentrado
	EP-12-53313	1 mL	concentrado
	EP-12-53314	1 mL	pronto para uso
	EP-12-53316	6 mL	pronto para uso

- Diluição recomendada : 1:100 – 1:150
- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : EPR20330
- Isotipo Ig : Coelho IgG
- Imunógeno : N/A
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Seção de tecido de melanoma primário ou metastático.
- Marcação : Nuclear

### Aplicações conhecidas

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

### Especificações:

O antígeno PRAME é expresso no melanoma (PRAME), ou antígeno LB33-E, faz parte da família de proteínas nucleares de melanoma reconhecidas por T citolítico linfócitos e é codificado por um gene do mesmo nome (PRAME) localizado na região cromossômica 22q11.22.

A proteína PRAME foi caracterizada como um inibidor dominante do receptor de ácido retinóico, portanto participando do bloqueio da proliferação celular, diferenciação ou apoptose induzida por ácido retinóico através dos receptores RARA, RARB e RARG. Assim, a superexpressão de PRAME em células tumorais confere uma vantagem de sobrevivência sobre as células normais. Em melanomas, a inibição de PRAME restaura a sinalização do ácido retinóico e restabelece a sensibilidade das células tumorais aos efeitos antiproliferativos desta molécula.

Em células normais, o antígeno PRAME é expresso em testículos, ovário, placenta, glândula adrenal e endométrio, sendo negativos em outros tecidos. Nos melanomas, a proteína reconhecida pelo PRAME anticorpo expresso em 87% dos melanomas metastáticos e 83,2% de melanomas primários. Entre os diferentes subtipos de melanoma, PRAME é positivo em 94,4% dos melanomas acrais, 92,5% dos superficiais espalhando melanomas, 90% dos melanomas nodulares, 88,6% dos melanomas lentigo do tipo maligno, 35% dos melanomas desmoplásticos e quase em todos os úvea melanomas. Em contraste, mais de 85% das novas lesões melanocíticas são negativas, com apenas uma minoria das células de alguns nevos displásicos, traumatizados ou nevos recorrentes e nevos de Spitz sendo positivos. Melanócitos isolados de pele normal ou com lesão actínica crônica também pode mostrar coloração nuclear. O anticorpo não reconhece apenas a pele melanomas, mas sua positividade ocasional também tem sido mencionado em carcinomas de pulmão de células não pequenas, mama, carcinomas renais ou de ovário e algumas leucemias, como bem como no sarcoma sinovial e lipossarcomas. Por fim, a expressão difusa e intensa de PRAME em carcinomas escamosos de origem tímica ajuda no diagnóstico diferencial com diferentes tipos de timomas, especialmente com aqueles do tipo B3, em que a expressão é fraca e em células isoladas. Da mesma forma, a negatividade de PRAME em CD117-e CD5-positivo Timomas B3 sugere que a integração do Anticorpo PRAME em um painel de anticorpos específicos para lesões tímicas podem ser úteis.

### 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 (Muscae Plus / EasyPath) e a(s) lâmina(s) no recipiente com tampão EDTA 10X pH8,5 (Recomendado EP-12-20553/6 EasyPath) ou Diva (Biocare), 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.

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](http://www.grupoerviegas.com.br).

### Bibliografia

1. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlée L, Hernandez M, Bernards R. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell*. 2005 Sep 23;122(6):835-47
2. Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*. 1997 Feb;6(2):199-208.
3. van Baren N, Chambost H, Ferrant A, Michaux L, Ikeda H, Millard I, Olive D, Boon T, Coulie PG. PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells. *Br J Haematol*. 1998 Sep;102(5):1376-9
4. Williams JM, Chen GC, Zhu L, Rest RF. Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol Microbiol*. 1998 Jan;27(1):171-86.
5. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS, Hollmann TJ, Busam KJ. PRAME Expression in Melanocytic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov;42(11):1456-1465.
6. Taniguchi Y, Ishida M, Saito T, Ryota H, Utsumi T, Maru N, Matsui H, Hino H, Tsuta K, Murakawa T. Preferentially expressed antigen in melanoma as a novel diagnostic marker differentiating thymic squamous cell carcinoma from thymoma. *Sci Rep*. 2020 Jul 23;10(1):12286.
7. Chisholm KM, Rivetta CV, Heerema-McKenney A. PRAME immunohistochemical staining in transient abnormal myelopoiesis and myeloid leukemia associated with Down syndrome. *Ann Clin Lab Sci*. 2015 Spring;45(2):121-7