

PHOX2B – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (EP312)

Rabbit anti-human PHOX2B Monoclonal Antibody (Clone EP312)

Código	EP-12-52543	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	EP312 ³
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético correspondente ao PHOX2B humano.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Seção de tecido de neuroblastoma ou cólon normal.
• 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 PHOX2B (também conhecido como PMX2B ou NBPHOX) está localizado na região cromossômica 4p13 e codifica um fator de transcrição nuclear que, durante o desenvolvimento embrionário, expressa-se predominantemente no sistema nervoso autônomo, sendo essencial na diferenciação e sobrevivência dos neurônios vegetativos e células cromafins. Mutações do gene PHOX2B são responsáveis pela síndrome da hipoventilação central, síndrome com transmissão autossômica dominante, na qual a hipoventilação é secundária à redução ou ausência de resposta ventilatória à hipercapnia ou à hipoxemia progressiva. Por definição, não deve haver doenças neuromusculares específicas do sistema nervoso central; doenças metabólicas, pulmonares, cardíacas ou outras lesões que explicam a hipercapnia. Esta síndrome está associada a tumores de origem da crista neural, incluindo neuroblastoma, bem como à doença de Hirschsprung devido à falta de desenvolvimento dos neurônios vegetativos dos plexos mioentéricos. Em tecidos normais, a positividade nuclear de PHOX2B é observada nos neurônios vegetativos durante todo o desenvolvimento embrionário e continua nos adultos. No diagnóstico diferencial com outros pequenos tumores de células SBRCT (como tumor de Wilm, sarcoma de Ewing ou rabiomiossarcoma), o anticorpo mostrou sua especificidade em todos os estágios de diferenciação do neuroblastoma primário e metastático. Sua coloração nuclear permite uma interpretação exata e fácil, evitando os artefatos de coloração e falsos positivos do CD57 ou Synaptophysin, especialmente em biópsias ósseas descalcificadas. O PHOX2B não é importante apenas no diagnóstico do neuroblastoma, mas também no estadiamento e no acompanhamento da doença, uma vez que a coloração é mantida apesar da fibrose, inflamação abundante ou calcificação difusa, às vezes observada nas amostras pós-tratamento. Em um estudo que incluiu outros tumores neuronais ou neuroendócrinos, todos de origem em crista neural, o anticorpo mostrou coloração em neuroblastomas, ganglioneuroblastomas e ganglioneuromas, bem como em 40% dos paragangliomas, enquanto feocromocitoma, carcinomas de células de Merkel, carcinomas neuroendócrinos do pulmão e do trato gastrointestinal, tumores com tireóide, paratireóide e origem adrenocortical ou melanomas têm sido negativos.

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. Yokoyama M, Nishi Y, Yoshii J, Okubo K, Matsubara K. Identification and cloning of neuroblastoma-specific and nerve tissue-specific genes through compiled expression profiles. *DNA Res.* 1996 Oct 31;3(5):311-20.
2. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, Trang H, de Pontual L, Gener B, Trochet D, Etchevers H, Ray P, Simonneau M, Vekemans M, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003 Apr;33(4):459-61.
3. Bielle F, Freneaux P, Jeanne-Pasquier C, et al. PHOX2B immunolabeling: a novel tool for the diagnosis of undifferentiated neuroblastomas among childhood small round blue-cell tumors. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:1141-1149.
4. Nonaka D, Wang BY, Edmondson D, Beckett E, Sun CC. A study of gata3 and phox2b expression in tumors of the autonomic nervous system. *Am J Surg Pathol.* 2013 Aug;37(8):1236-41.
5. Hata JL, Correa H, Krishnan C, Esbenshade AJ, Black JO, Chung DH, Mobley BC. Diagnostic utility of PHOX2B in primary and treated neuroblastoma and in neuroblastoma metastatic to the bone marrow. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Apr;139(4):543-6.
6. Hung YP, Lee JP, Bellizzi AM, Hornick JL. PHOX2B reliably distinguishes neuroblastoma among small round blue cell tumours. *Histopathology.* 2017 Nov;71(5):786-794.
7. Warren M, Matsuno R, Tran H, Shimada H. Utility of Phox2b immunohistochemical stain in neural crest tumours and non-neural crest tumours in paediatric patients. *Histopathology.* 2017 Oct 7. doi: 10.1111/his.13412. [Epub ahead of print].
8. Lee JP, Hung YP, O'Dorisio TM, Howe JR, Hornick JL, Bellizzi AM. Examination of PHOX2B in adult neuroendocrine neoplasms reveals relatively frequent expression in pheochromocytomas and paragangliomas. *Histopathology.* 2017 Oct;71(4):503-510.