

## Bcl-2 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone EP36

Rabbit Anti-Human Bcl-2 Monoclonal Antibody (Clone EP36)

Código	EP-12-50163	1ml	Concentrado
	EP-12-50161	0.1ml	Concentrado
	EP-12-50164	1ml	Pronto para uso
	EP-12-50166	6ml	Pronto para uso

- Diluição recomendada : 1:50 – 1:150
- Validade e lote do produto : Ver frasco
- Temperatura de armazenamento : 2 à 8°C (não congelar)
- Clone : EP36
- Isotipo Ig : Coelho IgG
- Imunógeno : Péptido sintético correspondente a resíduos entre BH3 e BH4 da proteína Bcl-2 humana.
- Reatividade : RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
- Controle positivo : Amígdala
- Marcação : Citoplasma celular

### Aplicações conhecidas

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

### Especificações:

A família de proteínas Bcl-2 regula a apoptose pelo controle da permeabilidade mitocondrial e liberação do citocromo C. Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica que reside na parede mitocondrial externa e inibe a liberação do citocromo C. A expressão excessiva de Bcl-2 mostrou promover a sobrevivência das células suprimindo a apoptose. Foi documentado que bcl-2 torna-se desregulada nas células tumorais como resultado da translocação para o locus da cadeia pesada da imunoglobulina e é, portanto, ativada nas malignidades das células B. O anticorpo Bcl-2 é útil na diferenciação do linfoma folicular da proliferação folicular reativa (negativa para bcl-2). Além disso, a expressão bcl-2 tem mostrado estar correlacionada com o prognóstico da doença em câncer de mama, câncer de próstata, câncer de ovário, endométrio ou câncer de cólon. A sensibilidade deste anticorpo no diagnóstico do linfoma folicular é superior à do outro anticorpo Bcl-2, conforme relatado por Masir et al. Coloração Nucleolar por ponto é frequentemente observada com este anticorpo e não deve interferir com a interpretação da coloração.

### 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 entrarem 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 investigador 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 IHC 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), 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).

#### **Referências Bibliográficas**

1. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY: Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *Am J Pathol.* 137:225-32 (1990).
2. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ: Cell-type-and tumour-type-related patterns of bcl-2 reactivity in mesenchymal cells and soft tissue tumours. *Virchows Arch.* 433:255-60 (1998).
3. Adams JM, Cory S: Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci.* 26:61-6 (2001).
4. Bouillet P, Strasser A: BH3-only proteins -evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci.* 115:1567-74 (2002).
5. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, Meert AP, Steels E, Vallot F, Verdebout JM, Lafitte JJ, Sculier JP: Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 89:55-64 (2003).
6. Sohn SK, Jung JT, Kim DH, Kim JG, Kwak EK, Park T, Shin DG, Sohn KR, Lee KB: Prognostic significance of bcl-2, bax, and p53 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol.* 73:101-7 (2003).
7. Linjawi A, Kontogianna M, Halwani F, Edwardes M, Meterissian S: Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *J Am Coll Surg.* 198:83-90 (2004).
8. Kouraklis G, Kakisis J, Theoharis S, Tzonou A, Glinavou A, Raftopoulos J, Karatzas G: Prognostic significance and correlation with survival of bcl-2 and TGF-beta RII in colon cancer. *Dig Dis Sci.* 48:2284-9 (2003).
9. Kaur P, Kallakury BS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS: Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 128:39-43 (2004).
10. Snuderl M, Kolman OK, Chen YB, Hsu JJ, Ackerman AM, Dal Cin P, Ferry JA, Harris NL, Hasserjian RP, Zukerberg LR, Abramson JS, Hochberg EP, Lee H, Lee AI, Toomey CE, Sohani AR. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2010 Mar;34(3):327-40.
11. Masir N, Campbell LJ, Goff LK, Jones M, Marafioti T, Cordell J, Clear AJ, Lister TA, Mason DY, Lee AM. BCL2 protein expression in follicular lymphomas with (14;18) chromosomal translocations. *Br J Haematol.* 2009 Mar;144(5):716-25