

## CD25 - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Clone (4C9)

Mouse Anti-Human CD25 Monoclonal Antibody (4C9)

Código	EP-12-50573	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	4C9
• Isotipo Ig	:	Camundongo IgG <sup>2</sup>
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético derivado de N-terminal do ACTH humano
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Seção de tecido de leucemia de células pilosas.
• Marcação	:	Citoplasma e Membrana 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 molécula CD25, também conhecida como receptor IK-2 alfa, IL2RA, p55, receptor de fator de crescimento de células T (EGFR) ou antígeno TAC é um antígeno de ativação presente, juntamente com CD4, em células T reguladoras. O gene que controla sua expressão, com 8 exons e acima de 25 kb, codifica a subunidade alfa do receptor de superfície celular IL-2 e está localizado na região cromossômica 10p15.1. As células T reguladoras, desde que suprimem a ativação de células T autorreativas controlando a tolerância imunológica, previnem doenças autoimunes e, como efeitos colaterais negativos, evitam a destruição de células tumorais por linfócitos T citotóxicos e atuam como supressores das células NK. As deleções parciais do gene CD25 são responsáveis pela imunodeficiência 41 (caracterizada pela associação de várias síndromes linfoproliferativas com doenças autoimunes) e pelo diabetes mellitus insulino-dependente tipo 10, uma variante do diabetes mellitus tipo I associada a doenças autoimunes e com agregação familiar típica. Em tecidos normais, o CD25 pode ser expresso por linfócitos B e T ativados, macrófagos e osteoblastos. Alguns tímócitos, precursores mielóides e oligodendrócitos também podem mostrar imunocoloração. Esta molécula não é expresso em mastócitos normais. De acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde, o principal critério diagnóstico para o envolvimento da medula óssea pela mastocitose sistêmica (SM) é a presença de agregados densos (mais de 15 células) de mastócitos. Além disso, a quantificação de células T reguladoras (Treg) expressando CD25 no contexto do carcinoma hepatocelular tem sido usada como um preditor independente de recorrência tumoral após a ressecção hepática de um carcinoma hepatocelular prévio. A porcentagem de células T regulatórias FOXP3 + CD25 + infiltrando entre células tumorais de melanoma e em sua periferia é significativamente maior em melanomas com capacidade recorrente do que em suas formas não recorrentes. Finalmente, CD25 em conjunto com CD103 e CD123 é útil para completar o painel de marcadores de leucemia de células pilosas, embora os dois últimos anticorpos tenham maior especificidade e sensibilidade para este diagnóstico do que o próprio CD25. Da mesma forma, devido à sua baixa especificidade geral, a coloração positiva do anticorpo CD25 deve ser avaliada dentro de um painel de anticorpos, não isoladamente, e em correlação com os aspectos morfológicos remanescentes das lesões analisadas, visto que muitos linfomas B, linfoma T ou mesmo anaplásicos grandes linfoma de células pode apresentar coloração contra este marcador.

### 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 (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 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 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 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. Zhao Y, Wu K, Cai K, Zhai R, Tao K, Wang G, Wang J. Increased numbers of gastric-infiltrating mast cells and regulatory T cells are associated with tumor stage in gastric adenocarcinoma patients. *Oncol Lett.* 2012 Oct;4(4):755-758.
2. Venkataraman G, Aguhar C, Kreitman RJ, Yuan CM, Stetler-Stevenson M. Characteristic CD103 and CD123 expression pattern defines hairy cell leukemia: usefulness of CD123 and CD103 in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2011 Oct;136(4):625-30
3. Morgado JM, Sánchez-Muñoz L, Teodósio CG, Jara-Acevedo M, Alvarez-Twose I, Matito A, Fernández-Núñez E, García-Montero A, Orfao A, Escribano L. Immunophenotyping in systemic mastocytosis diagnosis: 'CD25 positive' alone is more informative than the 'CD25 and/or CD2' WHO criterion. *Mod Pathol.* 2012 Apr;25(4):516-21.
4. Hahn HP, Hornick JL. Immunoreactivity for CD25 in gastrointestinal mucosal mast cells is specific for systemic mastocytosis. *Am J Surg Pathol.* 2007 Nov;31(11):1669-76.
5. Hollmann TJ, Brenn T, Hornick JL. CD25 expression on cutaneous mast cells from adult patients presenting with urticaria pigmentosa is predictive of systemic mastocytosis. *Am J Surg Pathol.* 2008 Jan;32(1):139-45.
6. Goudy K, Aydin D, Barzaghi F, Gambineri E, Vignoli M, Ciullini Mannurita S, Doglioni C, Ponzoni M, Cicalese MP, Assanelli A, Tommasini A, Brigida I, Dellepiane RM, Martino S, Olek S, Aiuti A, Ciceri F, Roncarolo MG, Bacchetta R. Human IL2RA null mutation mediates immunodeficiency with lymphoproliferation and autoimmunity. *Clin Immunol.* 2013 Mar;146(3):248-61.
7. Leonard WJ, Depper JM, Kanehisa M, Krönke M, Peffer NJ, Svetlik PB, Sullivan M, Greene WC. Structure of the human interleukin-2 receptor gene. *Science.* 1985 Nov 8;230(4726):633-9.
8. Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, Jones R, Ring SM, McArdle W, Pembrey ME, Strachan DP, Dunger DB, Twells RC, Clayton DG, Todd JA. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2005 May;76(5):773-9.
9. Sharfe N, Dadi HK, Shahar M, Roifman CM. Human immune disorder arising from mutation of the alpha chain of the interleukin-2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3168-71