

FoxP3 – Anticorpo Monoclonal anti-humano – Clone (SP97)

Rabbit anti-human FoxP3 Monoclonal Antibody (Clone SP97)

Código	EP-12-51453	1ml
• Diluição recomendada	:	1:20
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	SP97
• Isotipo Ig	:	Coelho IgG
• Imunógeno	:	Peptídeo sintético correspondente ao terminal-C da FoxP3 humana.
• Reatividade	:	RUO – (Humanos – não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Amígdala
• 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:

A família de proteínas humanas FOX consiste em pelo menos 43 fatores de transcrição, entre os quais a proteína FoxP3, cujo gene está localizado na região cromossômica Xp11.23. As proteínas desta família estão envolvidas em uma ampla gama de processos, incluindo controle da proliferação e diferenciação celular, regulação imunológica e transdução de sinal. A Foxp3 desempenha um papel muito importante na regulação da ativação de células T e atua como transativador repressor transcrricional suprimindo genes de citocinas pela competição com o fator NF-AT / AP1 controlando a produção de citocinas como IL-2, IL-4, IFN gamma, Fator estimulante de TNF e colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Além do importante papel que a FOXP3 desempenha na regulação da resposta imune, estudos recentes mostraram que esta molécula pode atuar como um fator supressor tumoral na neoplasia intraepitelial da próstata, mama (especialmente em sua variante tripla negativa) e ovário, entre outros. Geralmente, a expressão de FOXP3 tem caráter duplo, significando que geralmente alguns tecidos normais com coloração nuclear positiva podem desenvolver tumores negativos e, vice-versa, quando tecidos normais negativos ocasionalmente produzem tumores positivos. É o caso, por exemplo, do epitélio prostático e dos ductos mamários, onde o FOXP3 é expresso constitutivamente ao nível nuclear, ou ductos pancreáticos e melanócitos, onde a coloração é negativa. Nestes tumores, a presença de numerosas células positivas está associada a uma resposta mais fraca à quimioterapia.

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 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 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 horizontal, comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05022.

Câmara pressurizada MuscaePlus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Dois 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 desparafinação 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.Katoh H, Zheng P, Liu Y. FOXP3: Genetic and epigenetic implications for autoimmunity. *J Autoimmun.* 2013 Jan 10. doi:pII: S0896-8411(12)00150-3. 10.1016/j.jaut.2012.12.004. [Epub ahead of print]
- 2.García M, Bellosillo B, Sánchez-González B, García-Payarols F, Seoane A, Ferrer AM, Gimeno E, Barranco LE, Torner A, Solé F, Besses C, Serrano S, Salar A. Study of regulatory T-cells in patients with gastric malt lymphoma: influence on treatment response and outcome. *PLoS One.* 2012;7(12):e51681
- 3.Suzuki K, Kadota K, Sima CS, Nitadori JI, Rusch VW, Travis WD, Sadelain M, Adusumilli PS. Clinical Impact of Immune Microenvironment in Stage I Lung Adenocarcinoma: Tumor Interleukin-12 Receptor β 2 (IL-12R β 2), IL-7R, and Stromal FoxP3/CD3 Ratio Are Independent Predictors of Recurrence. *J Clin Oncol.* 2012 Dec 26. [Epub ahead of print]
- 4.Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. *Oncogene.* 2010 Jul 22;29(29):4121-9
- 5.Held-Feindt J, Hattermann K, Sebens S, Krautwald S, Mehdorn HM, Mentlein R. The transcription factor Forkhead box P3 (FoxP3) is expressed in glioma cells and associated with increased apoptosis. *Exp Cell Res.* 2012 Dec 1. doi:pII: S0014-4827(12)00475-2. 10.1016/j.yexcr.2012.11.018. [Epub ahead of print]
- 6.West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K, Deleeuw RJ, Nelson BH, Watson PH. Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2013 Jan 15;108(1):155-62
- 7.Lee S, Cho EY, Park YH, Ahn JS, Im YH. Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. *Acta Oncol.* 2013 Jan;52(1):73-81
- 8.Frattini V, Pisati F, Speranza MC, Poliani PL, Frigé G, Cantini G, Kapetis D, Cominelli M, Rossi A, Finocchiaro G, Pellegatta S. FOXP3, a novel glioblastoma oncosuppressor, affects proliferation and migration. *Oncotarget.* 2012 Sep 22. [Epub ahead of print]