

## Anidrase carbônica 9 - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Clone (EP161)

Rabbit anti-human Carbonic Anhydrase 9 Monoclonal Antibody (Clone EP161)

Código	EP-12-50363	1ml
• Diluição recomendada	:	1:50
• Validade e lote do produto	:	Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:	2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:	EP161 <sup>3</sup>
• Isotipo Ig	:	IgG
• Imunógeno	:	Um péptido sintético correspondente a resíduos no domínio extracelular da anidrase carbônica humana 9 foram utilizados como imunógeno.
• Reatividade	:	RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:	Estômago para tecido normal e carcinoma de células renais para tecido anormal.
• Marcação	:	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:

As anidrases carbônicas (ACs) são uma grande família de metaloenzimas de zinco que catalisam a hidratação reversível do dióxido de carbono. Eles participam de uma variedade de processos biológicos, incluindo respiração, calcificação, equilíbrio ácido-base, reabsorção óssea e formação de humor aquoso, líquido cefalorraquidiano, saliva e ácido gástrico. Eles mostram extensa diversidade na distribuição tecidual e localização subcelular. Crê-se que a anidrase carbônica 9, um membro da família da anidrase carbônica, desempenha um papel na regulação da proliferação celular em resposta a condições hipóxicas e pode estar envolvida na oncogênese e na progressão do tumor. A anidrase carbônica 9 (CA9) tem um padrão de expressão distinto nos tecidos normais e cancerígenos. A expressão mais abundante de CA9 foi encontrada na mucosa normal do estômago e da vesícula biliar. Outros tecidos normais têm menor ou nenhuma expressão. Níveis relativamente elevados de CA9 são expressos em carcinomas do colo do útero, rim, pulmão, mama e muitos outros tumores. A maioria dos estudos demonstrou que os níveis diminuídos de CA9 estão independentemente associados a uma sobrevida fraca. Baixos níveis de CA9 podem se beneficiar mais do tratamento adjuvante do que pacientes com níveis elevados.

### 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 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 IHC 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 (Muscau 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 Muscau Plus (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](http://www.grupoerviegas.com.br).

### Referências Bibliográficas

- 1.Hewett-Emmett D, Tashian RE. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol Phylogenet Evol.* 1996;5:50-77
- 2.Nakagawa Y, Uemura H, Hirao Y, Yoshida K, Saga S, Yoshikawa K. Radiation hybrid mapping of the human MN/CA9 locus to chromosome band 9p12-p1
3. Genomics. 1998 1;53:118-1193.Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001 Mar;158(3):905-19
- 4.Dorai T, Sawczuk I, Pastorek J, Wiernik PH, Dutcher JP. Role of carbonic anhydrases in the progression of renal cell carcinoma subtypes: proposal of a unified hypothesis. *Cancer Invest.* 2006 Dec;24(8):754-79
- 5.Al-Ahmadie HA, Alden D, Fine SW, Gopalan A, Touijer KA, Russo P, Reuter VE, Tickoo SK. Role of immunohistochemistry in the evaluation of needle core biopsies in adult renal cortical tumors: an ex vivo study. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:949-961
- 6.Genega EM, Ghebremichael M, NajarianR, Fu Y, Wang Y, Argani P, Grisanzio C, Signoretti S. Carbonic anhydrase IX expression in renal neoplasms: correlation with tumor type and grade. *Am J Clin Pathol.* 2010;134:873-879
- 7.etof AS, Rabbani ZN, Hardee ME, Kim SJ, Broadwater G, Bentley RC, Snyder SA, Vujaskovic Z, Oosterwijk E, Harris LN, Horton JK, Dewhirst MW, Blackwell KL. Carbonic anhydrase IX is a predictive marker of doxorubicin resistance in early-stage breast cancer independent of HER2 and TOP2A amplification. *Br J Cancer.* 2012;106:916-922
- 8.DeSimone G, Supuran CT. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804:404-409