



## HISTOSONDA GHRL (Ghrelin/Obestatin)

Referencia: CBM-0021-R5

Ensayo para 5 reacciones individuales en un único vial. 65µl por reacción

Clasificación del producto:

\*Países miembros de la Unión Europea  
\*Para Utilización en el Diagnóstico In Vitro\*

### INTRODUCCIÓN

La Ghrelina es un ligando endógeno para el receptor secretagogo de la hormona hipofisaria de crecimiento y han sido descritos tumores neuroendocrinos productores de Ghrelina que cursaban clínicamente con acromegalia.

Entre otras funciones de la Ghrelina son destacables su acción orexigénica (estímulo de la ingesta de alimentos) y su estímulo sobre la producción de ácido clorhídrico por las células parietales del estómago.

Múltiples trabajos han relacionado determinados pacientes obesos con un incremento sérico de los niveles de Ghrelina. Algunas publicaciones han demostrado el papel de la Ghrelina inhibiendo la producción de leptina.

La Ghrelina es producida por células neuroendocrinas que preferentemente se sitúan en las glándulas productoras de ácido clorhídrico del cuerpo gástrico. Algunos autores también han descrito células productoras de Ghrelina en otras localizaciones anatómicas aunque un mapeo exhaustivo con hibridación "in situ" aun no ha sido realizado.

Nosotros hemos encontrado casos de hiperplasias y tumores de células neuroendocrinas gástricas productores de Ghrelina (datos aún no publicados). Histosonda GHRL consiste en un fragmento de DNA monocatenario de 241 nucleótidos de longitud dirigida contra el RNA de la Ghrelina. Su utilidad es la detección de las células productoras de esta hormona y la de sus tumores.

### FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico in Vitro

La Histosonda GHRL es útil para la detección de las células productoras de esta hormona y la de sus tumores.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda GHRL ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional y debe ser manipulado por personal cualificado y debidamente entrenado.

Para la obtención de unos resultados adecuados, deben seguirse fielmente las instrucciones del manual. Cualquier cambio en las temperaturas o tiempos indicados, o en cualquier otro paso del proceso, puede dar lugar a resultados erróneos.

Este producto contiene azida sódica (NaN<sub>3</sub>) como conservante en su composición. A las concentraciones en las que está presente (<0,1%) no está clasificado como peligroso. Una vez desechado el producto, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.

### COMPONENTES

1 tubo con la cantidad necesaria de la Histosonda GHRL para 5 reacciones individuales.

La Histosonda GHRL consiste en un segmento de DNA de una sola cadena complementaria al RNA que se expresa de esta proteína y tiene una longitud de 241 nucleótidos. Esta sonda ha sido marcada con Digoxigenina.

### CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Los reactivos suministrados se almacenan a temperatura 3-7°C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta. No utilizar el producto después de la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

### MUESTRAS

Cortes histológicos de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina de 4-6 micrómetros de espesor.

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las muestras en las que se observe expresión de la Ghrelina deberán mostrar una coloración marrón en el citoplasma celular que contrastará sobre el fondo azul-violeta que confiere la tinción con hematoxilina. El facultativo valorará los resultados en base a su experiencia a partir de la visualización de las señales observadas en la muestra, en paralelo con las señales observadas en las muestras de control positivo y control negativo para la expresión de este gen.

### LIMITACIONES DEL ENSAYO

La Histosonda GHRL ha sido optimizada para detectar la expresión de su RNA en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. No se recomienda la utilización de otro tipo de muestras o de técnicas de preparación. El funcionamiento del producto ha sido validado utilizando los protocolos indicados en el manual de instrucciones.

La utilización de otros procedimientos o las modificaciones de los protocolos recomendados, pueden conducir a resultados erróneos.

Los resultados de este ensayo deben ser evaluados por el facultativo en combinación con el resto de datos clínicos del paciente de los que se disponga.

Para la obtención de unos resultados óptimos y reproducibles es muy importante ajustarse rigurosamente a las condiciones de tiempos y temperaturas indicadas en el procedimiento.

### INSTRUCCIONES DE USO

Para la utilización de las sondas marcadas con Digoxigenina.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Hibridación In Situ Cromogénica (CISH), es una técnica utilizada para determinar la presencia de una secuencia de ADN o ARN, o estudiar la expresión de un gen así como la evaluación simultánea de la morfología del tejido mediante el uso de microscopía de campo claro.

La sonda marcada, de secuencia conocida, se hibrida con su diana en el tejido problema. Esta unión se detecta mediante un proceso inmunohistoquímico.

Las Histosondas, cuya diana es el RNA mensajero, están destinadas a hacer visibles los genes que se expresan detectando la expresión génica.

### Protocolo de HistoSonda

**Para mayor información incluyendo Preguntas más Frecuentes y Apoyo Técnico por favor consulte el Manual Técnico completo de HistoSonda.**

Antes de comenzar, precaliente la cámara húmeda a 62°C.

#### 1a. Desparafinación

1. Caliente los portaobjetos a 62°C durante 10mins utilizando una placa caliente o un incubador.
2. Introduzca los portaobjetos en el siguiente orden en:
  - a. Xileno: 10 mins
  - b. Xileno: 5mins
  - c. Alcohol absoluto (etanol o isopropanol): 1min X 2 veces
  - d. Alcohol 96%: 1min X 3 veces
  - e. Metanol con 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solo : 5mins
3. Lave enérgicamente los portaobjetos con agua destilada, manténgalos en agua 1min.

#### 1b. Inhibición de uniones inespecíficas de DNA (opcional)

Por lo general este paso no es necesario, a menos que el tejido que vaya a hibridar contenga una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares eosinófilos (generalmente médula ósea y tejidos gástricos).

1. Introducir los portaobjetos en agua destilada hirviendo durante **30 segundos** e inmediatamente transfíralos a agua destilada a temperatura ambiente.

**¡ Importante:** un tratamiento térmico excesivo puede provocar una tinción de fondo. Saque los portaobjetos de manera inmediata. !

### 2. Desproteización

1. Preparar una dilución de Proteinasa K comercial a una concentración de 0,033 mg/ml en PBS pH 7.4.
2. Retire el exceso de agua de cada portaobjetos con un pañuelo de papel.
3. Cubra el tejido con 200µl de Proteinasa K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave enérgicamente con agua destilada.
5. Introduzca los portaobjetos en PBS pH 7.4 durante 2mins.

**¡ (Importante):** si los cortes han sido tratados previamente con calor en microondas, use la Proteinasa K sólo durante 5 minutos, ya que este tratamiento sensibiliza mucho los tejidos para esta enzima. **Las médulas óseas requieren una digestión de 20 min a 55°C con Proteinasa K tras su tratamiento con calor. !**

### 3. Incubación con la sonda

1. Retire el exceso de buffer del portaobjetos con un pañuelo de papel.
2. Añada 65µl de sonda al corte asegurándose de que todo el tejido queda cubierto y de que no quedan burbujas de aire.
3. Coloque los cristales en posición horizontal en una cámara húmeda y cierre bien.
4. Incube a 62°C durante 1 h.
5. Si no dispone de una cámara húmeda apropiada, ponga una gota (65µl) de sonda sobre un cubreobjetos de 24x50 mm y colóquelo sobre el tejido. Selle los bordes del cubreobjetos con pegamento. Incube en una estufa a 62°C o en una placa caliente durante una hora. Después de la incubación, retire con cuidado el pegamento y el cubreobjetos y continúe con el protocolo.

### 4. Lavado de la sonda

**¡ La solución de la sonda es muy viscosa. Es muy importante lavar bien los cristales para asegurarse de que la solución de la sonda es completamente retirada. !**

1. Lave la superficie del tejido vigorosamente con PBS pH 7.4 para retirar toda la sonda.
2. Agite en PBS durante 5mins.

### 5. Revelado de la sonda

Protocolo para el revelado manual de la sonda.

1. Retire el exceso de buffer de los cortes como anteriormente.
2. Cubra el tejido con 100 µl de Anti-Digoxina (no suministrado con este producto) que reconozca el anticuerpo primario utilizado sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
3. Lave enérgicamente con PBS pH 7.4 y agite en PBS durante 1min.
4. Retire el exceso de buffer de los cortes.
5. Ponga una gota de un polímero comercial HRP (no suministrado con este producto) que reconozca el anticuerpo primario utilizado sobre el tejido (suficiente para cubrir todo el tejido 50-100µl) e incube en una cámara húmeda siguiendo las instrucciones del fabricante.
6. Lave vigorosamente con PBS pH 7.4, agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.
8. Lave con agua destilada.
9. Tiña los cortes brevemente (2-3secs) con hematoxilina Harris diluida al 50% en agua destilada.
10. Lave con agua destilada, deshidrate y haga el montaje de los cristales siguiendo los protocolos habituales del laboratorio.

Fecha de emisión: 23/08/2016



HISTOSONDA GHRL (Ghrelin/Obestatin)

Reference: CBM-0021-R5

Assay for 5 individual reactions in one vial. 65µl for reaction.

Product classification:

\*EU countries  
\*For In Vitro Diagnostics\*

## INTRODUCTION

Ghrelin is an endogenous ligand for the secretagogue receptor of the pituitary growth hormone. Neuroendocrine tumors producing Ghrelin have been described as clinically developing with acromegaly.

The notable functions of Ghrelin, amongst others are its orexigenic action (stimulation of the ingestion of alimentation) and its stimulus of hydrochloric acid production by the stomach parietal cells.

Many studies have related some obese patients with a seric increase of Ghrelin. Some publications have demonstrated that Ghrelin plays a part in inhibiting the production of leptin.

Ghrelin is produced by neuroendocrine cells that are preferably situated in the hydrochloric acid producing glands of the gastric body.

Some authors have also described cells that produce Ghrelin in other anatomic localizations although an exhaustive "in situ" hybridization map has not yet been made.

Cenbimo has found cases of hyperplasia and tumors of gastric neuroendocrine cells that produce Ghrelin (data not yet published).

Histosonda GHRL consists of a fragment of single stranded DNA, 241 nucleotides in length targeted against Ghrelin RNA.

The use of this probe is the detection of cells producing this hormone and their tumors.

## INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.

Histosonda GHRL is useful for the detection of cells producing this hormone and their tumors.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda GHRL has been designed for professional use in In Vitro Diagnosis and must be manipulated by qualified and accordingly trained personnel. In order to obtain the best results, the instructions contained in the manual must be followed. Any change to the indicated temperatures, times or any other step of the process can lead to poor results.

## COMPONENTS

1 tube with the necessary amount of Histosonda GHRL for developing 5 single reactions  
Histosonda GHRL consists of a segment of single-stranded DNA complementary to expressed RNA with a length of 241 nucleotides. This probe has been labeled with Digoxigenin.

## STORAGE CONDITIONS

Supplied reagents are stored at 3-7°C until expiration date. Do not use after expiration date.

## SAMPLES

Block sections of formalin fixed paraffin embedded tissues. Sections of 4-6 micrometers in width are sufficient to conduct the study.

## INTERPRETATION OF RESULTS

Samples in which Ghrelin expression is observed will show a brownish color in the cell cytoplasm, which will contrast over the blue-violet background given by hematoxylin staining. The pathologist will evaluate the results according to their experience, drawing conclusions from the staining of the sample, in parallel with the staining observed in the positive and negative controls.

## ASSAY LIMITATIONS

Histosonda GHRL has been optimized to detect Ghrelin RNA expression in formalin-fixed, paraffin-

embedded tissues. Its use is not recommended for other types of samples or preparation techniques.

The correct operation of this product has been validated using the protocols indicated in the instructions manual. The use of other procedures or the modification of the recommended protocols may lead to erroneous results.

The results from this assay must be evaluated by the pathologist in combination with the rest of available patient clinical data.

In order to obtain optimal and reproducible results it is important to rigorously maintain the time and temperature conditions indicated in the procedure.

## PROCEDURE

For Digoxigenin- labeled probes

### BASIS OF THE METHOD

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) is a technique used to determine the presence of a DNA or RNA sequence or to study gene expression, as well as for the simultaneous evaluation of tissue morphology by white light microscopy. A labeled probe of known sequence hybridizes with its target in the tissue being studied. This hybridization is then detected by an immunohistochemical process.

The Histosondas targets are messenger RNA and they are therefore designed to detect and visualise gene expression.

### HistoSonda Protocol

#### Needed accessories for this protocol and not provided with the product

Proteinase K, Anti-Digoxin Antibody, polímero comercial anti-mouse HRP comercial polymer, Diaminobenzidine (DAB) solution.

For further important details including FAQs and Troubleshooting please ask for the complete **HistoSonda Technical Manual at the email address: techserv@cenbimo.com**

Before starting pre-heat the humid chamber to 62°C.

#### 1a. Deparaffinization

1. Heat slides at 62°C for 10mins using a hot plate or incubator.
2. Immerse slides in:
  - a. Xylene: 10 mins
  - b. Xylene: 5mins
  - c. Absolute alcohol (ethanol or isopropanol): 1min X 2
  - d. Alcohol 96%: 1min X 3
  - e. Methanol containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only: 5mins
3. Wash well with distilled water, leave standing in water.

#### 1b. Inhibition of unspecific DNA binding (optional)

Generally this step is not necessary unless the tissue to be hybridized contains a great quantity of polymorphonuclear eosinophil leukocytes (generally **bone marrow and gastric tissues**).

1. Place slides in boiling distilled water for **30 seconds** and immediately transfer to distilled water at room temp.

! **Important:** excess heat treatment will result in background staining. Remove slides immediately. !

#### 2. Deproteinization

1. Prepare a dilution of any commercial Proteinase K at a work concentration of 0,033 mg/ml in PBS pH 7.4.
2. Remove excess water from individual slides with tissue paper.
3. Cover tissue sections with the 200µl of Proteinase K and incubate in a humid chamber for exactly 10mins at room temp.
4. Wash well with distilled water.
5. Transfer to PBS pH 7.4 for 2mins.

! **(Important:** if the slides have been boiled in the microwave previously only use Proteinase K for 5 minutes as the heat treatment will have significantly sensitized the tissue sections. **Bone marrows require a Proteinase K digestion of 20min at 55°C after heat treatment** !

#### 3. Incubation with the probe

1. Remove excess buffer from sections as described previously.
2. Add 65µl of probe to the tissue section ensuring the entire section is com-

pletely covered and avoiding air bubbles.

3. Place the slides in a horizontal position in a humid chamber and close well.
4. Incubate at 62°C for 1hr.

#### 4. Washing the probe

! **The probe solution is very viscous. It is very important to wash the slides well to ensure the probe solution is completely removed.**!

1. Wash the surface of the section vigorously with PBS pH 7.4 to remove the probe.
2. Agitate in PBS for 5mins.

#### 5. Revealing the probe

Protocol for manual revealing of the probe.

1. Remove excess buffer from sections as before.
2. Cover sections with 100µl of Anti-Digoxin (not provided with this product) following manufacturer's instructions and incubate in a humid chamber for 30mins at room temp.
3. Wash vigorously with PBS pH 7.4 agitate in PBS for 1min.
4. Remove excess buffer from sections.
5. Drop commercial HRP polymer (not provided with this product) that binds the primary antibody used before over the sections (enough to cover the tissue 50-100µl) and incubate in a humid chamber following the manufacturer's instructions.
6. Wash vigorously with PBS pH 7.4, agitate in PBS 1min.
7. Remove excess buffer from sections and apply commercial Diaminobenzidine (DAB) (not provided with this product) following the manufacturer's instructions.
8. Wash with distilled water.
9. Counter stain the sections briefly (2-3secs) with Harris hematoxylin diluted 50% in distilled water.
10. Wash with distilled water, dehydrate and cover slip following normal laboratory protocols.

Emission date: 23/08/2016



Manufacturer: **CENBIMO S.L.**  
C/Doctor Iglesias Otero s-n  
27004-Lugo, Spain