



## HISTOSONDA GLUCAGÓN

Referencia: CBM-0012-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 INSULINA es producida en las células β de los islotes de Langerhans pancreáticos. Aproximadamente entre los 2/3 o 3/4 de las células de un páncreas de adulto son células productoras de insulina.

En un páncreas normal de adulto, los islotes de Langerhans no superan un diámetro máximo de 300µm. En procesos inflamatorios y fibróticos, los islotes pueden estar más agrandados y también pueden no tener una forma esférica. Cuando los islotes superan un tamaño de 500 µm los denominamos "microadenomas" y la posibilidad de enfermedades genéticas como MEN 1 (Multiple Endocrine Neoplasia type I) deber ser planteada. En los islotes no tumorales las células productoras de insulina se disponen uniformemente por todo su volumen y son muy abundantes. Las células productoras de GLUCAGÓN tienen cierta tendencia a disponerse periféricamente aunque también se encuentran en su interior. Las células productoras de SOMATOSTATINA son las más escasas y no muestran ninguna preferencia en su localización. Algunas células productoras de somatostatina pueden tener morfología fusiforme.

Rara vez encontramos en los islotes pancreáticos células productoras de GASTRINA y de VIP (Vaso active intestinal peptide) y por este motivo a estas hormonas se las considera ectópicas al páncreas. Aunque algunos pacientes tienen gastrinomas y vipomas pancreáticos, su localización más frecuente es en el duodeno.

Los tumores benignos del páncreas endocrino es más probable que clínicamente presenten un síndrome funcional debido al péptido que producen mientras que los tumores malignos van a expresar rara vez un síndrome funcional.

Tanto los tumores benignos como malignos del páncreas endocrino muestran diversidad de células productoras de diversos péptidos, es decir, se encuentran células productoras de insulina, glucagón y somatostatina, pero frecuentemente expresan una en mayor cantidad y característicamente los islotes normales no tumorales expresan ese péptido con una intensidad mucho menor, probablemente debido a un fenómeno inhibitorio de retroalimentación.

En algunos casos de tumores endocrinos del páncreas no funcionales se ha descrito ausencia de proteína por inmunohistoquímica pero si presencia de RNA de esa proteína, haciendo de este modo más útil la hibridación "in situ" que la inmunohistoquímica para el estudio de estos tumores y de sus metástasis.

## FINALIDAD PREVISTA

Para su uso en diagnóstico In Vitro, la Histosonda Glucagón es útil para el Estudio y tipificación de los tumores neuroendocrinos del páncreas y del aparato digestivo y de sus metástasis aun en ausencia de Síndrome Endocrino clínicamente evidente.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

La Histosonda Glucagón ha sido diseñada para su utilización en el diagnóstico in vitro para uso profesional, y debe ser manipulada por personal cualificado y debidamente entrenado. Para la obtención de unos resultados adecuados, debe 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 suficiente de la Histosonda Glucagón para 5 reacciones individuales.

La Histosonda Glucagón consiste en un segmento de ADN de una sola cadena con una longitud de 414 nucleótidos, complementaria al RNA expresado. 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 del Glucagón 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 Glucagón 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 solicite el Manual Técnico completo de HistoSonda en la siguiente dirección de correo: techserv@cenbimo.com.**

**Accesorios necesarios para el desarrollo del protocolo pero no suministrados con el producto:** Proteínasa K, Anticuerpo Anti-Digoxina, polímero comercial anti-ratón HRP, solución de Diaminobenzidina (DAB).

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 energícamente los portaobjetos con agua destilada y 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. Desproteínización

1. Preparar una dilución de Proteína 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 Proteína K e incube en una cámara húmeda exactamente 10mins a temperatura ambiente.
4. Lave energícamente 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 Proteínasa 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 Proteínasa 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. Incuba a 62°C durante 1 h.

### 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 anticuerpo Anti-Digoxina (no suministrado con este producto) en las condiciones de uso especificadas por el fabricante e incube en una cámara húmeda durante 30mins a temperatura ambiente.
3. Lave energícamente con PBS, y agite en 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, agite en PBS durante 1min.
7. Retire el exceso de buffer de los tejidos y aplique una dilución de Diaminobenzidina (DAB) (no suministrada con este producto) 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 GLUCAGON

Reference: CBM-0012-R5

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

Product classification:  
\*EU countries  
"For In Vitro Diagnostics"

## INTRODUCTION

Insulin is produced by the pancreatic  $\beta$  cells in the islets of Langerhans. Between approximately 2/3 and 3/4 of adult pancreatic cells are producers of insulin. In the normal adult pancreas, the islets of Langerhans do not exceed a diameter of 300µm. In inflammatory or fibrotic processes the islets can be enlarged and can also be aspherical. When the islets exceed a diameter of 500µm they are referred to as "micro adenomas" and the possibility of genetic diseases such as MEN 1 (Multihormonal neoplasia 1) must be considered. In non tumoral islets the insulin producing cells are uniformly distributed over the entire islets and are very abundant. GLUCAGON producing cells have the tendency to be distributed peripherally although they can also be found in the interior of the islets. SOMATOSTATIN producing cells are the most scarce and do not demonstrate any preference of localization. Some somatostatin producing cells can have a fusiform morphology.

We rarely encounter GASTRIN and VIP (Vasoactive intestinal peptide) producing cells in the pancreatic islets and for this reason these hormones are considered ectopic to the pancreas. Although some patients have pancreatic gastrinomas and vipomas, their localization most frequently is in the duodenum.

It is more probable that benign pancreatic endocrine tumors clinically present a functional syndrome due to the peptide that they produce while malignant tumors will only rarely display a functional syndrome.

Both benign and malignant pancreatic endocrine tumors show a diversity of cells producing diverse peptides including insulin, glucagon and somatostatin, but they frequently express one of these peptides in a greater quantity than normal. Non tumoral islets of Langerhans will express this peptide at a much lesser intensity probably due to the inhibitory feedback phenomenon.

In some cases of pancreatic non-functional endocrine tumors, these tumors have been immunohistochemically found to have an absence of a protein although the RNA for this protein is present. Therefore, in situ hybridization is a much more useful technique for studying this kind of tumor and their metastasis.

## INTENDED USE

For use in In Vitro Diagnosis.

Histosonda Glucagon is useful for the study and classification of neuroendocrine tumors of the pancreas and digestive apparatus and their metastasis even in an absence of a clinically evident Endocrine Syndrome.

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

Histosonda Glucagon 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.

This product contains sodium azide as a preservative (NaN<sub>3</sub>). Sodium azide is below the threshold level of 0,1% (w/v) of the total, and therefore it is not considered to be a hazardous substance. Small quantities may be eliminated in the waste water system.

## COMPONENTS

1 tube with the necessary amount of Histosonda Glucagon for developing 5 single reactions.

Histosonda Glucagon consists of a fragment of single-stranded DNA with a length of 414 nucleotides, complementary to expressed RNA. 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 glucagon 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 Glucagon has been optimized to detect 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](mailto: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 completely 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.
5. If no suitable humid chamber is available drop the 65µl of probe over a 24 X 50mm coverslip and place over the tissue section. Seal the edges of the coverslip with rubber cement. Incubate in a 62°C incubator or over a hot plate for 1 hour. After incubation carefully remove the rubber cement and coverslip and continue the protocol.

### 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, 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