



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização  
REF: LPS 045-S/LPS 045

RET Breakapart Probe



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

#### Utilização prevista

A RET Breakapart Probe destina-se a identificar, através da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), rearranjos da região RET no cromossoma 10q na localização q11.21. Destina-se a ser utilizada em secções de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) ou microarrays de tecido (TMA). Este produto é apenas para uso profissional e destina-se a ser um adjuvante da Citogenética clínica.

#### Contexto

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvimentos recentes fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada também à avaliação de biopsias de tumores sólidos, o que pode fornecer informações importantes para a previsão da progressão do tumor. As metodologias atuais, nomeadamente a imuno-histoquímica ou a "blotting", podem fornecer informações ao nível da expressão genética. Quando é realizada em secções de tecido (quer incluído em criostato ou parafina), a FISH pode fornecer informações ao nível do gene, *in situ*, no local exato dentro do tumor. Isto pode revelar a heterogeneidade entre células e permitir a deteção de pequenos clones de células geneticamente distintas.

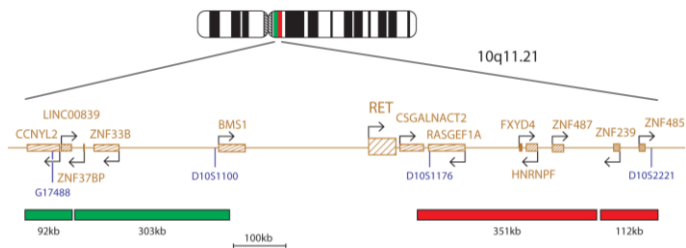
#### Informações sobre a sonda

O gene RET (*proto-oncogene ret*) em 10q11 codifica para um recetor de tirosina quinase transmembranar envolvido no controlo da diferenciação celular, proliferação celular e sobrevivência celular<sup>1</sup>.

Os rearranjos que envolvem o gene RET são anomalias recorrentes reconhecidas em 1–2% dos doentes com adenocarcinomas pulmonares, onde é observado fundido com KIF5B<sup>2,3</sup>, e o carcinoma papilífero da tiroide, onde é observado fundido a vários genes parceiros diferentes, incluindo: CCDC6, PRKAR1A e NCOA4<sup>4,5</sup>. As características das proteínas codificadas por todos os tipos de genes de fusão RET são semelhantes às de ALK: os domínios espiralados nos parceiros de fusão de terminal N causam a dimerização dos domínios RET, resultando na ativação da tirosina quinase RET na ausência de ligandos<sup>3</sup>.

#### Especificação da sonda

RET,10q11.21,Verde  
RET,10q11.21,Vermelho



A RET Breakapart Probe consiste em duas sondas (92 kb, 303 kb), marcadas a verde, situadas proximalmente ao gene RET e abrangendo os marcadores G17488 e D10S1100, e duas sondas (351 kb, 112 kb), marcadas a vermelho, situadas distalmente ao gene RET e abrangendo os marcadores D10S1176 e D10S2221.

#### Materiais Fornecidos

**Sonda:** 50 µl por tubo (5 testes) ou 100 µl por tubo (10 testes)

Quantidade de sonda vermelha de RET: 68–118ng/teste

Quantidade de sonda verde de RET: 411–615ng/teste

As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas para uso.

**Contracorante:** 150 µl por frasco (15 testes)

O contracorante é o DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindol]).

#### Advertências e Precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Use luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratógeno. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto com a pele. Use luvas, uma bata de laboratório e manuseie num exaustor de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Use luvas e uma bata de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
5. Elimine todos os materiais perigosos de acordo com as diretrizes da sua instituição para a eliminação de resíduos perigosos.
6. Os operadores têm de ser capazes de distinguir visualmente as cores vermelha, azul e verde.

#### Conservação e Manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura entre -25 °C e -15 °C, até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Os frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

#### Equipamento necessário, mas não fornecido

1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
2. Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1 µl e 200 µl.
3. Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de Microscópio de Fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência.
9. Centrifugadora de bancada.
10. Lâminas de microscópio.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.
15. Kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100).

#### Recomendação de Microscópio de Fluorescência

Utilize uma lâmpada de mercúrio de 100 watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x para obter a melhor visualização possível. Utilize um filtro passa-banda tripla DAPI/FITC/Texas Red para obter a melhor visualização possível em simultâneo das substâncias fluorescentes vermelhas e verdes e DAPI. Alternativamente, para a visualização de substâncias fluorescentes vermelhas e verdes, utilize o filtro passa-banda duplo FITC/Texas Red.

Verifique o microscópio de fluorescência antes de o utilizar para garantir que está a funcionar corretamente. Utilize um óleo de imersão que seja adequado à microscopia de fluorescência e formulado para baixa autofluorescência. Siga as recomendações do fabricante relativamente à vida útil da lâmpada e à duração dos filtros.

#### Preparação das Amostras

O kit foi concebido para utilização em secções de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) ou microarrays de tecido (TMA) e deve ser preparado de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição. Utilize secções de tecido FFPE de 4 µm–6 µm de espessura para a FISH.

#### Pré-tratamento das amostras de tecido

O pré-tratamento das amostras de tecido deve ser feito de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. Utilize o kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100) para obter os melhores resultados.

#### Protocolo do FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda às luzes do laboratório está sempre limitada)

#### Pré-desnaturação

1. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à temperatura ambiente (TA). Centrifugue os tubos brevemente antes de os utilizar
2. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
3. Retire 10 µl–15 µl de sonda por cada teste e transfira para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
4. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
5. Coloque 10 µl–15 µl da solução de sonda na amostra e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

#### Desnaturação

6. Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos.

#### Hibridização

7. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/- 1 °C) durante toda a noite.

### Lavagens pós-hibridização

8. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
9. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/-1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
10. Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
11. Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
12. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
13. Visualize com um microscópio de fluorescência.

### Comentários

A eficiência da hibridização e a morfologia dos tecidos estão geralmente correlacionadas negativamente. Os procedimentos de pré-tratamento agressivos que melhoram a eficiência da hibridização (por exemplo, um tempo prolongado de digestão enzimática) tendem a destruir a estrutura das células e a morfologia dos tecidos. No entanto, o pré-tratamento suave poupando as estruturas de tecido pode não ser suficiente para a penetração da sonda e para obter resultados de FISH bem-sucedidos.

A duração ideal do pré-tratamento térmico e do tempo de digestão enzimática dependerá da idade do bloco, da composição do tecido e da qualidade da fixação do tecido. Reduza a digestão enzimática para biopsias de agulha grossa e quaisquer secções que contenham poucas células tumorais ou que tenham grandes áreas de necrose. Manuseie estas amostras com especial cuidado para evitar uma digestão excessiva.

### Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante um período máximo de 1 mês se conservadas no escuro a uma temperatura inferior a 4 °C.

### Recomendações para o Procedimento

1. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
2. Utilize um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, aparelhos de banho-maria e incubadoras, visto que essas temperaturas são críticas para o ótimo desempenho do produto.
3. As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
4. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.
5. Uma hibridização excessiva pode resultar em sinais adicionais ou inesperados.
6. Os utilizadores devem otimizar o protocolo para as suas próprias amostras antes de utilizarem o teste para efeitos de diagnóstico.

### Resultados Esperados

Numa célula normal, espera-se dois sinais de fusão vermelho/verde (2F). Numa célula com um rearranjo de RET equilibrado, o padrão de sinais esperado é uma fusão, um vermelho e um verde (1R, 1G, 1F). Outros padrões de sinais são possíveis em espécimes aneuploides/desequilibrados.

### Reatividade Cruzada Conhecida

Nenhuma reatividade cruzada conhecida.

### Limitações

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

O não cumprimento do protocolo pode afetar o desempenho e os resultados. Este kit não foi validado para outros efeitos que não os indicados na secção da utilização prevista.


### Informações Adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048  
E: techsupport@cytozell.com  
W: www.ogt.com

### Bibliografia

1. Asai N, et al. Mol Cell Biol. 1995;15(3):1613–9
2. Kohno T et al., Nat Med 2012;18(3):375-7
3. Ju YS et al., Genome Res 2012;22(3):436-45
4. Colato C, et al., Eur J Endocrinol. 2015;172(5):571–82
5. Romei C et al., Front Endocrinol 2012;3:54

REF	PT: Número de catálogo
IVD	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
LOT	PT: Código de lote
	PT: Consulte as Instruções de utilização
	PT: Fabricante
	PT: Prazo de validade
	PT: Limites de temperatura
	PT: Suficiente para <n> testes
CONT	PT: Conteúdo

### Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.

Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation que está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigação na área das ciências da vida.



### CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,  
418 Cambridge Science Park,  
Milton Road,  
Cambridge, CB4 0PZ, UK  
T: +44(0)1223 294048  
F: +44(0)1223 294986  
E: probes@cytozell.com  
W: www.ogt.com