

ROS1 - Anticorpo Monoclonal anti-humano - Proto-Oncogene Tirosina-Proteína Quinase - Clone (D4D6)

Rabbit anti-human ROS1 (Proto-Oncogene Tyrosine-Protein Kinase ROS) - Monoclonal Antibody (Clone D4D6)

| Código | EP-12-52733 | 1ml |
|--------------------------------|-------------|---|
| • Diluição recomendada | : | 1:50 |
| • Validade e lote do produto | : | Ver frasco |
| • Temperatura de armazenamento | : | 2 à 8°C (não congelar) |
| • Clone | : | D4D6 |
| • Isotipo Ig | : | Coelho IgG |
| • Imunógeno | : | Proteína sintética correspondente ao resíduo do domínio C-terminal da proteína ROS1 humana. |
| • Reatividade | : | RUO - (Humanos - não testados em outras espécies) |
| • Controle positivo | : | Estômago normal / culturas celulares previamente caracterizadas. |
| • Marcação | : | Citoplasma e 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:

A proteína proto-oncogênica tirosina-quinase transmembrana ROS, mais conhecida como ROS1, é uma proteína pertencente à subfamília tirosina-quinase dos receptores de insulina cuja produção é codificada pelo gene ROS (MCF3), localizado na região cromossômica 6q22.1. Após sua ativação, esse gene intervém em inúmeras vias moleculares relacionadas à diferenciação, proliferação, crescimento e sobrevivência celular, incluindo a ativação da via PI3K-mTOR. As aberrações cromossômicas que afetam o gene ROS foram descritas no glioblastoma multiforme através de fusões da porção C-terminal de ROS1 com o domínio N-terminal da FIG (fundido em glioblastoma) codificado no gene GOPC. A proteína quimérica GOPC-ROS1 está localizada no nível do aparelho de Golgi e apresenta atividade como receptor de tirosina quinase. Outras fusões de ROS1 com genes diferentes, tais como SLC34A2, CD74, EZR, LRIG3, SDC4, TPM3, CCDC6 ou KDELR2 entre outros, têm como resultado o aparecimento e expressão de várias proteínas quiméricas em 1-3% dos casos de adenocarcinoma pulmonar e representa o alvo terapêutico para Crizotinib e moléculas análogas. Coloração inespecífica em macrófagos e pneumócitos tipo II reativos também foi descrita em casos isolados, enquanto adenocarcinomas mucinosos em geral apresentam coloração citoplasmática difusa na ausência da translocação do gene ROS1. A fim de identificar os casos de carcinomas pulmonares com translocações de ROS1, técnicas complexas de RT-PCR e FISH podem ser utilizadas, embora o anticorpo monoclonal D4D6 tenha sido recentemente validado como uma ferramenta de triagem útil para casos positivos de imunocoloração contra ROS1, que em estudos comparativos através de técnicas de hibridização *in situ* com sondas de ruptura, provou uma sensibilidade e especificidade de mais de 95%. Para considerar um caso como positivo para ROS1, a imunocoloração tem que ser forte ou moderadamente intensa na membrana e / ou no citoplasma em mais de 75% das células tumorais. Dependendo do tipo de fusão do gene ROS1, outros padrões de imunocoloração podem ser expressos como citoplasmáticos puntiformes nos casos CD74-ROS1 ou citoplasmáticos com acentuação linear na membrana lateral ou apical nos casos EZR-ROS1. Embora a morfologia do tumor não possa ser considerada como um critério para selecionar os casos positivos de ROS1, os padrões de crescimento sólido, micropapilar, ribriiforme e anel de sinete foram observados com maior frequência entre os casos positivos de ROS1. A coloração focal e de baixa intensidade também pode ser observada em até 30% dos casos não translocados. Portanto, o resultado deve ser confirmado com outros métodos analíticos. 50% dos tumores miofibroblásticos inflamatórios também apresentam translocação do gene ALK, enquanto os restantes apresentam um perfil genético pouco conhecido. Foi recentemente comprovado, num número relativamente pequeno de casos, que até 10% destes tumores apresentam coloração citoplasmática difusa ou puntiforme contra o clone D4D6 (com a translocação confirmada através das técnicas de FISH e RT-PCR). Neste mesmo estudo, o anticorpo demonstrou fraca coloração nuclear em casos de tumores estomacais gastrointestinais, sarcomas miofibroblásticos, leiomiossarcomas e sarcomas de células dendríticas foliculares. Menos de 1% dos adenocarcinomas colorretais e até 5% dos adenocarcinomas do estômago podem apresentar translocações do gene ROS1 e conseqüente coloração citoplasmática. A baixa porcentagem de adenocarcinomas colorretais torna o gene um potencial alvo terapêutico, mas, no caso dos adenocarcinomas do estômago, pode representar uma alternativa terapêutica, uma vez que, em geral, os casos positivos de ROS1 apresentam um fenótipo não amplificado de HER2 e MET.

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 - Desparafinização - 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 TRIS-EDTA 10X pH9 (Recomendado EP-12-20554/5 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 desparafinizar, 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 MuscaePlus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Dois séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCENDENTE: para desparafinizar 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 desparafinização 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. Charest A, Lane K, McMahon K, Park J, Preisinger E, Conroy H, Housman D. Fusion of FIG to the receptor tyrosine kinase ROS in a glioblastoma with an interstitial del(6)(q21q21). *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 May 24;37(1):58-71
2. Yoshida A, Tsuta K, Wakai S, Arai Y, Asamura H, Shibata T, Furuta K, Kohno T, Kushima R. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod Pathol*. 2014 May;27(5):711-20
3. Boyle TA, Masago K, Ellison KE, Yatabe Y, Hirsch FR. ROS1 immunohistochemistry among major genotypes of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2015 Mar;16(2):106-11
4. Shan L, Lian F, Guo L, Qiu T, Ling Y, Ying J, Lin D. Detection of ROS1 gene rearrangement in lung adenocarcinoma: comparison of IHC, FISH and real-time RT-PCR. *PLoS One*. 2015 Mar 5;10(3):e0120422
5. Cha YJ, Lee JS, Kim HR, Lim SM, Cho BC, Lee CY, Shim HS. Screening of ROS1 rearrangements in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry and comparison with ALK rearrangements. *PLoS One*. 2014 Jul 24;9(7):e103333.
6. Rogers TM, Russell PA, Wright G, Wainer Z, Pang JM, Henricksen LA, Singh S, Stanislaw S, Grille J, Roberts E, Solomon B, Fox SB. Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015 Apr;10(4):611-8. Viola P, Maurya M, Croud J, Gazdova J, Suleman N, Lim E, Newsom-Davis T, Plowman N, Rice A, Montero MA, Gonzalez de Castro D, Popat S, Nicholson AG. A Validation Study for the Use of ROS1 Immunohistochemical Staining in Screening for ROS1 Translocations in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016 Jul;11(7):1029-39
8. Hornick JL, Sholl LM, Dal Cin P, Childress MA, Lovly CM. Expression of ROS1 predicts ROS1 gene rearrangement in inflammatory myofibroblastic tumors. *Mod Pathol*. 2015 May;28(5):732-9
9. Houang M, Toon CW, Clarkson A, Sioson L, de Silva K, Watson N, Singh NR, Chou A, Gill AJ. ALK and ROS1 overexpression is very rare in colorectal adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015 Feb;23(2):134-8
10. Lee J, Lee SE, Kang SY, Do IG, Lee S, Ha SY, Cho J, Kang WK, Jang J, Ou SH, Kim KM. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. *Cancer*. 2013 May 1;119(9):1627-35.