



# SIGMA-ALDRICH®

## SEPARAÇÃO DE LEUCÓCITOS

(Procedimento N.º 1119)

### UTILIZAÇÃO PREVISTA

O HISTOPAQUE®-1119 e o HISTOPAQUE®-1077 da Sigma-Aldrich consistem numa preparação não esterilizada destinada ao isolamento de células mononucleares e granulócitos para exame histológico. Os reagentes HISTOPAQUE®-1119 foram concebidos para "utilização em diagnóstico in vitro". Este material, sem filtração adicional, não é adequado para a cultura de células separadas. Relativamente à cultura celular, o HISTOPAQUE®-1119 não se destina a fins de diagnóstico in vitro.

As soluções utilizadas para este fim são compostas por um meio de polissacarose e radiopaco. O HISTOPAQUE®-1077 é essa solução ajustada a uma densidade de 1,077. Quando o sangue é colocado em camadas no HISTOPAQUE®-1077 e é sujeito a forças centrífugas, as células mononucleares ficam agarradas à interface do plasma HISTOPAQUE® ao passo que os eritrócitos e granulócitos gravitam até ao fundo. Parece viável inventar um sistema onde as células da série mielóide pudessem igualmente ser colocadas em cultura utilizando-se um procedimento de apenas um passo. O HISTOPAQUE®-1119 foi desenvolvido para se atingir este objectivo e baseia-se nas observações de English e Andersen.<sup>1</sup>

De acordo com o procedimento da Sigma-Aldrich, é formado um gradiente duplo colocando-se uma camada de igual volume de HISTOPAQUE®-1077 sobre o HISTOPAQUE®-1119. O sangue total é cuidadosamente colocado em camada no meio superior de HISTOPAQUE®-1077. Os tubos são então centrifugados a 700 x g durante 30 minutos. As células da série granulocítica serão encontradas na interface 1077/1119 ao passo que os linfócitos, outras células e plaquetas mononucleares, são encontrados na interface plasma/1077.

### REAGENTE

HISTOPAQUE®-1119, N.º de Catálogo 1119-1  
Polissacarose, 6,0 g/dL, e diatrizoato de sódio, 16,7 g/dL.

#### ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE:

Armazenar o HISTOPAQUE®-1119 no frigorífico (2–8°C). Proteger da luz. O prazo de validade está indicado no rótulo do reagente.

#### DETERIORAÇÃO:

Um aspecto turvo indica a deterioração do produto.

#### PREPARAÇÃO:

O HISTOPAQUE®-1119 está pronto a ser utilizado. Aquecer a 18–26°C antes de utilizar.

Se a utilização pretendida das células separadas envolver cultura subsequente, o HISTOPAQUE®-1119 deve ser filtrado sob condições estéreis antes da separação das células. Para aplicações onde é necessária esterilidade, o HISTOPAQUE®-1119 deve ser filtrado sob condições estéreis antes da utilização.

#### PRECAUÇÕES:

Deverão ser aplicadas as precauções normais relativamente ao manuseamento de reagentes laboratoriais. Depois de entrar em contacto com substâncias de origem humana, tratar todos os reagentes e equipamento como sendo material biológico potencialmente perigoso. Eliminar os resíduos de acordo com todos os regulamentos locais, estaduais, regionais ou nacionais. Consultar a ficha de dados de segurança dos materiais para obter informações mais actualizadas sobre os riscos, perigos ou segurança.

#### Declarações de riscos e segurança dos EUA

As soluções HISTOPAQUE®-1077-1 e 1119-1 são NOCIVAS. Podem provocar sensibilização por inalação e em contacto com a pele. Usar vestuário de protecção adequado. Órgão alvo: Sangue.

#### Declarações de riscos e segurança da UE

As soluções HISTOPAQUE®-1077-1 e 1119-1 são NOCIVAS. Podem provocar sensibilização por inalação e em contacto com a pele. Não respirar os vapores. Usar vestuário de protecção e luvas adequadas. Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo se possível).

### PROCEDIMENTO

#### COLHEITA DE AMOSTRAS:

Recomenda-se que a colheita de amostras seja realizada de acordo com o documento M29-A2 da NCCLS. Nenhum método de teste conhecido poderá garantir totalmente que as amostras sanguíneas ou de tecido não irão transmitir infecções. Por essa razão, todos os derivados sanguíneos ou amostras de tecido deverão ser considerados potencialmente infecciosos.

Colher 6 mL de sangue venoso em heparina ou EDTA sem conservantes.

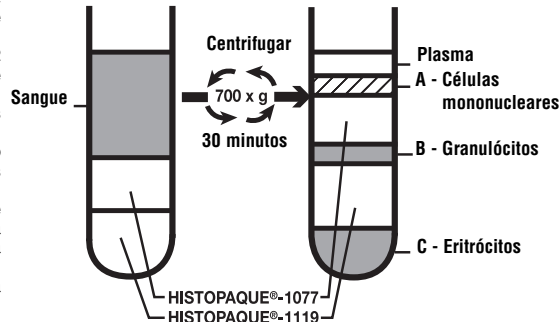
#### MATERIAIS ESPECIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS:

HISTOPAQUE®-1077, N.º de Catálogo 1077-1, Polissacarose, 5,7 g/dL, e diatrizoato de sódio, 9,0 g/dL.  
Centrífuga (rotor de cesto oscilante) com capacidade para gerar 700 x g  
Tubos de centrífuga, plásticos de 15-mL, cónicos

#### NOTAS:

- Se a utilização pretendida das células separadas envolver cultura subsequente, o HISTOPAQUE®-1119 deve ser filtrado sob condições estéreis antes da separação das células. Para aplicações onde é necessária esterilidade, o HISTOPAQUE®-1119 deve ser filtrado sob condições estéreis antes da utilização. Este produto é apenas para "Utilização in vitro". As células isoladas utilizando o HISTOPAQUE® não devem ser usadas em procedimentos in vivo.
- Também podem ser utilizados tubos de centrífuga de 50 mL. Alterar o procedimento indicado utilizando 12 mL de HISTOPAQUE®-1077, 12 mL de HISTOPAQUE®-1119 e 24 mL de sangue total ou diluído.
- Ocasionalmente poderá ser necessário diluir o sangue a 1:2 ou 1:4, dependendo do número de células absolutas. Existe a possibilidade de sobrecarregar o gradiente.
- Evitar utilizar luvas com pó. O pó para as luvas irá activar os monócitos e provocar resultados mais baixos.
- Evitar utilizar plásticos de elevada ligação, como o poliestireno. O poliestireno pode ligar as células às paredes do tubo de centrífuga.
- Preparar o gradiente imediatamente antes de utilizar. Se preparar os gradientes antecipadamente irá permitir a ocorrência de difusão, o que terá como resultado uma fraca recuperação celular.
- Colocar uma sobcamada de HISTOPAQUE®-1119 irá igualmente produzir um gradiente aceitável.
- Podem ser utilizados outros anticoagulantes. No entanto, a escolha do anticoagulante pode afectar a recuperação celular. À medida que o sangue vai envelhecendo haverá uma queda nas recuperações celulares.
- A secção do procedimento deste folheto informativo emprega a utilização de solução salina de tampão fosfato isotónico como diluente e fluido de lavagem. Podem ser utilizados outros reagentes, como o meio celular RPMI 1640, suplementado com soro bovino fetal.
- O procedimento descreve o isolamento das células em 6 mL de sangue total. Os volumes podem ser aumentados ou diminuídos, conforme necessário.
- Para cada execução, como controlo, recomendamos a utilização de um doente "normal".

- NOTA: As r.p.m. necessárias para gerar 700 x g podem ser calculadas utilizando o nomograma incluído neste folheto informativo.
- Retirar cuidadosamente os tubos de centrífuga. Devem ser observadas duas camadas opacas distintas (camada A e B na Figura abaixo).
  - Aspirar e eliminar o fluido até 0,5 cm da camada A. Transferir as células desta camada para um tubo marcado "mononuclear".
  - Aspirar e eliminar o fluido restante até 0,5 cm da camada C.



Transferir as células desta camada para um tubo marcado "granulócitos".

- Lavar as células adicionando aos tubos 10 mL de solução salina de tampão fosfato isotónico. Centrifugar durante 10 minutos a 200 x g. Remover o sobrenadante e eliminar.
- Ressuspender as células por aspiração suave com uma pipeta de Pasteur.
- Repetir os Passos 8 e 9 duas vezes.
- Ressuspender as células num volume apropriado de solução salina de tampão fosfato isotónico.

Nesta altura, pode realizar-se uma variedade de ensaios. Os procedimentos são escolhidos segundo o critério individual.

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os eritrócitos devem concentrar-se no fundo do tubo de centrífuga. Os granulócitos devem ficar em banda na interface entre o HISTOPAQUE®-1119 e o HISTOPAQUE®-1077. As células mononucleares devem ficar em banda na interface entre o HISTOPAQUE®-1077 e o plasma.

Se os resultados observados forem diferentes dos esperados, contactar a Assistência Técnica da Sigma-Aldrich para mais informações.

### BIBLIOGRAFIA

- English D, Andersen BR: Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradient of ficoll-hypaque. J Immunol Methods 5:249, 1974

HISTOPAQUE é uma marca registada da Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO EUA

A Sigma-Aldrich, Inc. garante que os seus produtos estão em conformidade com as informações contidas nesta e em outras publicações da Sigma-Aldrich. O comprador deverá determinar a adequação do(s) produto(s) ao fim particular a que se destinam. Poderão aplicar-se termos e condições adicionais. Consultar o verso da factura ou carta de porte para mais informações sobre os termos e condições de venda adicionais.

Procedimento N.º 1119  
Revisão Anterior: 2009-11  
Revisto: 2010-01



AR-MED Ltd., Runnymede Malthouse  
Egham, TW20 9BD Reino Unido

#### SIGMA-ALDRICH, INC.

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 EUA  
+1 314 771 5765

#### Assistência Técnica:

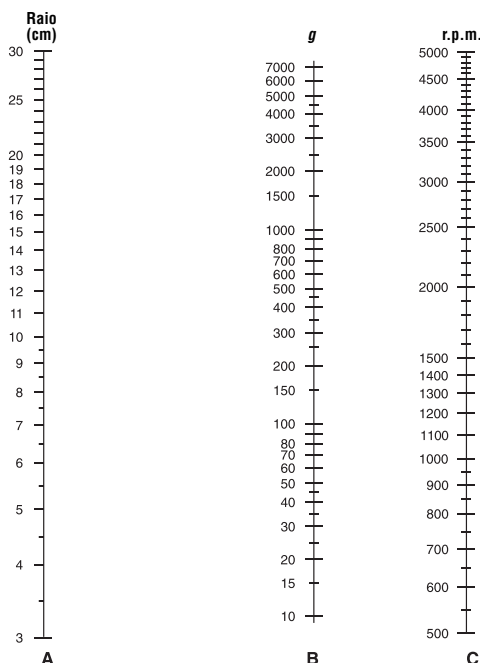
chamada paga no destino +1 314 771 3122  
ou endereço de correio electrónico:  
clintech@sial.com

#### Para encomendar:

chamada paga no destino +1 314 771 5750  
www.sigma-aldrich.com

SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH  
P.O. 1120, 89552 Steinheim, Alemanha  
49-7329-970

#### NOMOGRAMA PARA DETERMINAÇÃO DAS FORÇAS CENTRÍFUGAS RELATIVAS:



É utilizado um nomograma para derivar a definição de r.p.m. para a centrífuga.

Como estabelecer as r.p.m. necessárias a fim de se obterem 700 x g para o Procedimento n.º 1119.

- Medir o raio (cm) desde o centro do eixo da centrífuga até à extremidade do suporte dos tubos de ensaio. Marcar este valor na escala A.
- Marcar a força centrífuga relativa (por exemplo, 700) na escala B.
- Com uma régua, desenhar uma linha recta entre os pontos nas colunas A e B, aumentando-a até se cruzar com a coluna C. A leitura na coluna C é a definição das r.p.m. para a centrífuga.

#### PROCEDIMENTO:

- Adicionar 3 mL de HISTOPAQUE®-1119 num tubo de centrífuga cónico de 15 mL.
- Colocar cuidadosamente uma camada de 3 mL de HISTOPAQUE®-1077 sobre o HISTOPAQUE®-1119.
- Colocar cuidadosamente uma camada de 6 mL de sangue total sobre o gradiente superior do tubo do Passo 2.
- Centrifugar a 700 x g durante 30 minutos à temperatura ambiente (18–26°C). A centrifugação a temperaturas inferiores, como sejam 4°C, pode resultar na aglutinação celular e numa má recuperação.