Cultivo celular:

Formación de esferoides

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Elaboró: | Revisó: | Autorizó: |
| Nombre: | Dr. Oscar Medina Contreras | Dr. Oscar Medina Contreras | Dra. Jenny Vilchis Gil |
| Firma: |  |  |  |
| Fecha: | 2020-04-08 | 2020-04-08 | 2020-05-01 |

1. **Propósito**

Realizar un cocultivo celular en 3D con células estromales y células leucémicas para los fines que se requiera.

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen realizar cocultivo en 3D en la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez.

1. **Políticas de operación, normas y lineamientos**

Es responsabilidad de todo el personal técnico, científico y estudiantes adscritos a la Unidad de Investigación Epidemiológica en Endocrinología y Nutrición del Instituto Nacional de Salud Hospital Infantil de México Federico Gómez conocer y dar seguimiento a este procedimiento.

Los residuos de tipo CRETI (Corrosivas, Reactivas, Explosivas, Toxicas e Inflamables) se deberán eliminar con base en su clasificación y especificaciones de manejo según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002; así como sus características intrínsecas y su toxicidad al ambiente según la NOM-052-SEMARNAT- 2005.

1. **Descripción del Protocolo.**

* Contar con un cultivo de células estromales (ejemplo: OP-9, HS5) y un cultivo de células leucémicas (CCRF) por separado.
* Preparar agarosa al 1% (ver protocolo 01), llevarla a ebullición y mantener caliente.
* Preparar una placa de 96 pozos con fondo cóncavo y por columna agregar a cada pozo 100µl agarosa 1%, recubrir el pozo y retirar la agarosa, repetir el proceso para cada pozo de la columna.
* Dejar una columna sin recubrir de agarosa y agregar antibiótico al 1%.
* Repetir los dos pasos anteriores para recubrir toda la placa (Fig. 1).

**ANTIBIOTICO**

**ANTIBIOTICO**

**ANTIBIOTICO**

**ANTIBIOTICO**

**ANTIBIOTICO**

**ANTIBIOTICO**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B | A |  | A |  | A |  | A |  | A |  | A |  |
| C | G |  | G |  | G |  | G |  | G |  | G |  |
| D | A |  | A |  | A |  | A |  | A |  | A |  |
| E | R |  | R |  | R |  | R |  | R |  | R |  |
| F | O |  | O |  | O |  | O |  | O |  | O |  |
| G | S |  | S |  | S |  | S |  | S |  | S |  |
| H | A |  | A |  | A |  | A |  | A |  | A |  |

Figura 1. Esquematización de la preparación placa de 96 pozos fondo cóncavo con agarosa y antibiótico. Este diseño es opcional se puede optimizar la placa colocando solo algunos pozos con antibiótico sin embargo es importante este paso para no tener contaminación.

* Realizar el conteo celular de las células estromales.
* Sembrar 10,000 células por pozo en 100µl de medio, tratar de no mover la placa hasta el siguiente día.
* Una vez formada la esfera colocar 10,000 células leucémicas y nuevamente esperar un día sin mover la placa.
* Después de dos días observar en el microscopio invertido, el esferoide debe estar formado.

1. **Diagrama de Flujo**
2. **Documentos de Referencia**

Shain KH, Dalton WS, Tao J. 2015. The tumor microenvironment shapes hallmarks of mature B cell malignancies. Oncogene 34:4673-4682.