Obtención de células de

lamina propria intestinal

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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**

Obtener células de lámina propia de intestino de ratones de la cepa C57BL/6 para los fines que se requiera**.**

1. **Alcance**

Este procedimiento involucra a todo el personal técnico, científico y estudiantes que deseen extraer células de lámina propia de intestino de ratones de la cepa C57BL/6 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.

El manejo de animales de laboratorio, se debe de realizar según los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre las especificaciones técnicas para el cuidado, uso y disposición final de productos biológicos, excretas y cadáveres. Así como la norma oficial mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, que se generan en establecimientos que presten atención médica.

1. **Descripción del Protocolo**

* Precalentar a 37°C solución de PBS 1X y Solución de Hanks-SFB (5%).
* Sacrificar a los ratones por dislocación cervical. Una vez muertos los ratones, realizar una incisión abdominal por planos por piel y peritoneo. Separar el intestino delgado del estómago y hacer un corte en el píloro gástrico. Eliminar el ciego y continuar hasta el recto.
* Extraer cuidadosamente el intestino, retirar el tejido mesentérico adyacente y las placas de Peyer.
* Cortar el intestino longitudinal de extremo a extremo y colocarlo en una bandeja con PBS 1X/37°C y agitar suavemente. Transferir a una nueva bandeja y repetir dos veces el proceso.
* Cortar el intestino en fragmentos de 0.5cm y colocar en un tubo falcón (50ml): EDTA (2mM) en solución de Hanks-SFB (30ml). Agitar a 250 rpm/37°C/20 minutos.
* Remover el tejido y repetir la incubación con soluciones frescas.
* Cortar finamente el tejido en fragmentos de 1mm y agregar colagenasa tipo IV (1mg/ml) y DNasa I (800 µg) disueltas en solución de Hanks-SFB (20ml). Poner en agitación continua 200rpm/37°C/10 minutos.
* Pasar la solución por un colador celular de 100µm y colectar la suspensión celular, agregar 20ml de solución de Hanks-SFB frío. Centrifugar 1500 RPM/4°C/5 min.
* Resuspender el botón celular y contar las células en la cámara de Neubauer.

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

Denning, T. L. *et al.* Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol* 187, 733–747 (2011).

1. **Anexos**

|  |  |
| --- | --- |
| **Solución de Hanks con SFB (5%)** |  |
| HBSS Sigma H2387 | 4.75g |
| Bicarbonato de sodio | 0.17g |
| HEPES | 1.2g |
| SFB | 25ml |
| H₂Od (Aforar a) | 500ml |