

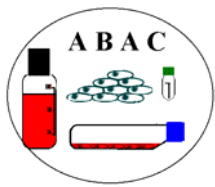


ASOCIACION BANCO ARGENTINO DE CELULAS

Pers. Jur. N°1.530.806
17 años de actividad

INDICE

- | | |
|-------|--|
| 1 | ANUNCIOS
Curso Teórico - Práctico |
| 2-16 | ARTÍCULO
Inmortalización de Células Primarias
G Stacey y C MacDonald |
| 17-20 | SERVICIOS ABAC |



**Asociación
Banco Argentino de Células**

***Garantía de Calidad
en Cultivos Celulares
Curso Teórico - Práctico***

Módulo II

PROGRAMA DE ACTIVIDADES

8.00 - 8.30 hs.: *Recepción – Inscripción de Asistentes al Curso.*

8.30 – 9. 15 hs.: *Enzimas de Desagregación*
Dra Susana García Franco.
Gema Biotech. Bs. As.

9.30 – 10.15 hs.: *Fuentes de Proteínas*
Dra Ana María Ambrosio.
Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas. INEVH Pergamino

Pausa

11.00 – 16.30 hs: *Sistematización en el manejo de insumos*
Taller con aplicaciones prácticas sobre los temas tratados
Dr Carlos Chiesa.
Responsable de Control y Aseguramiento de Calidad.
Laboratorios Gador SA. División Farmoquímica. Pilar. BsAs.

Lunch (libre ; no incluido)

Fecha: 7 de mayo 2003 de 8:30 a 17:30 hs.

Aranceles : no socios teórico \$ 30 Práctico \$ 30
 socios \$ 25 \$ 25

Lugar: Aula de la Federación Bioquímica Argentina
Viamonte 1167. 3 piso
Buenos Aires

Informes e Inscripción : ABAC
abac_informes@yahoo.com.ar
Julián Alvarez 1218 (C1414DRZ)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires

INMORTALIZACION DE CELULAS PRIMARIAS

Glyn Stacey¹ y Caroline MacDonald²

1. NIBSC, South Mimms, Herts, UK
2. Universidad de Paisley, Escocia, UK

Traducido por ABAC de: Cell Biology and Toxicology. 2001; 17:231-246.

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la progresión de las células a través del ciclo celular conducente a su proliferación está normalmente sujeta a una estricta regulación mediante la compleja y coordinada interacción entre ciclina (A- E) y quinasas ciclina dependientes (por revisión reciente ver Abu-Absi, 2000). Las células “inmortalizadas” escapan del control normal del ciclo celular. Así, ellas se dividen y crecen continuamente más allá de los límites vistos en tejidos “normales” y células primarias. Históricamente, esas líneas celulares continuas (LCC) han sido primariamente aisladas desde tumores y embriones.

En el caso de tumores las líneas celulares resultantes pueden originarse de células cancerosas que sobrellevan mutaciones secundarias que estabilizan, o de otra manera, modifican la expresión de oncogenes. Secuencias virales pueden también ser causa de la aparición de células inmortalizadas en cultivos celulares primarios. De todas maneras, en general cuando las células parecen originarse espontáneamente de tales cultivos, el mecanismo de su aparente inmortalidad replicativa es desconocido.

Cuando se está poniendo a punto un ensayo *in vitro* basado en el uso de células animales es importante determinar desde el comienzo qué tipo de sistema de cultivo es probable que responda mejor al objetivo. Está disponible un amplio panel de sistemas de cultivo celular *in vitro* para el investigador e incluyen órganos aislados y tejidos funcionales (cultivos de órganos), células primarias derivadas directamente de tejidos animales cultivados sin pasajes, líneas celulares finitas y líneas celulares continuas.

Las células primarias pueden proveer cultivos con características muy similares a las del tejido de origen, pero tienen algunas desventajas significativas. Puede haber considerable variación en las características de las preparaciones celulares de los diferentes animales individuales y el subcultivo de células primarias puede lograrse solamente con un limitado número de tipos celulares (ej.: fibroblastos, queratinocitos, astrocitos, células endoteliales). Aun cuando el subcultivo sea exitoso, éste frecuentemente genera cultivos de células con características alteradas. De esto son ejemplos típicos: susceptibilidad disminuida para la infección viral en epitelio primario de riñón, alteración en la resistencia de los melanocitos a la radiación, pérdida de marcadores endoteliales en células de endotelio umbilical humano.

Las líneas celulares finitas han sido usadas con gran efecto a través de los años, pero están casi completamente restringidas a fibroblastos y tienen un término limitado de vida. El uso de líneas celulares continua resuelve esas dos limitaciones. Sin embargo, en el pasado ellas han sido derivadas frecuentemente de tejidos tumorales anormales o mutantes generadas por tratamiento con químicos tóxicos o radiación y pueden no expresar algunas de las características típicas del tejido original.

La capacidad proliferativa y la relativa estabilidad de las líneas celulares continuas y finitas permite la preparación de stocks a granel llamados “bancos de células” que pueden ser controlados en su calidad. La disponibilidad de muestras confiables y reproducibles de amplia distribución y la preservación por tiempos prolongados mejora el nivel de estandarización que puede ser logrado en la investigación y en la industria.

En la figura 1 son ilustradas consideraciones importantes en el desarrollo de un modelo de célula animal *in vitro*. Mientras los requerimientos primarios cuando se comienza el desarrollo de modelos *in vitro* es la simulación de características observadas *in vivo* es también importante estimar las consecuencias técnicas, logísticas y regulatorias antes de realizar una selección definitiva. Desde el punto de vista técnico, confiabilidad, reproducibilidad y simplicidad son requerimientos clave. Las presiones económicas son invariablemente una consideración significativa. Así, el costo de establecer bioterios de cría de animales para proveer células y tejidos primarios puede ser prohibitiva, especialmente cuando son consideradas las demandas de tiempo y recursos, implícitas en el cumplimiento de las licencias gubernamentales y, más aún cuando existen fuertes argumentos éticos contra el uso de animales en la investigación y la industria.

Estos temas son abarcados en las políticas de “3 Rs” de la Unión Europea, que indican el reemplazo, reducción y refinamiento del uso de experimentación y muestreo *in vivo*.

Esta iniciativa ha sido ahora reforzada a escala global por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En este capítulo realizamos una revisión de un rango de técnicas de immortalización usadas para generar líneas celulares continuas e identificar temas críticos en la preparación y aceptabilidad de tales cultivos.

2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS INMORTALIZADOS

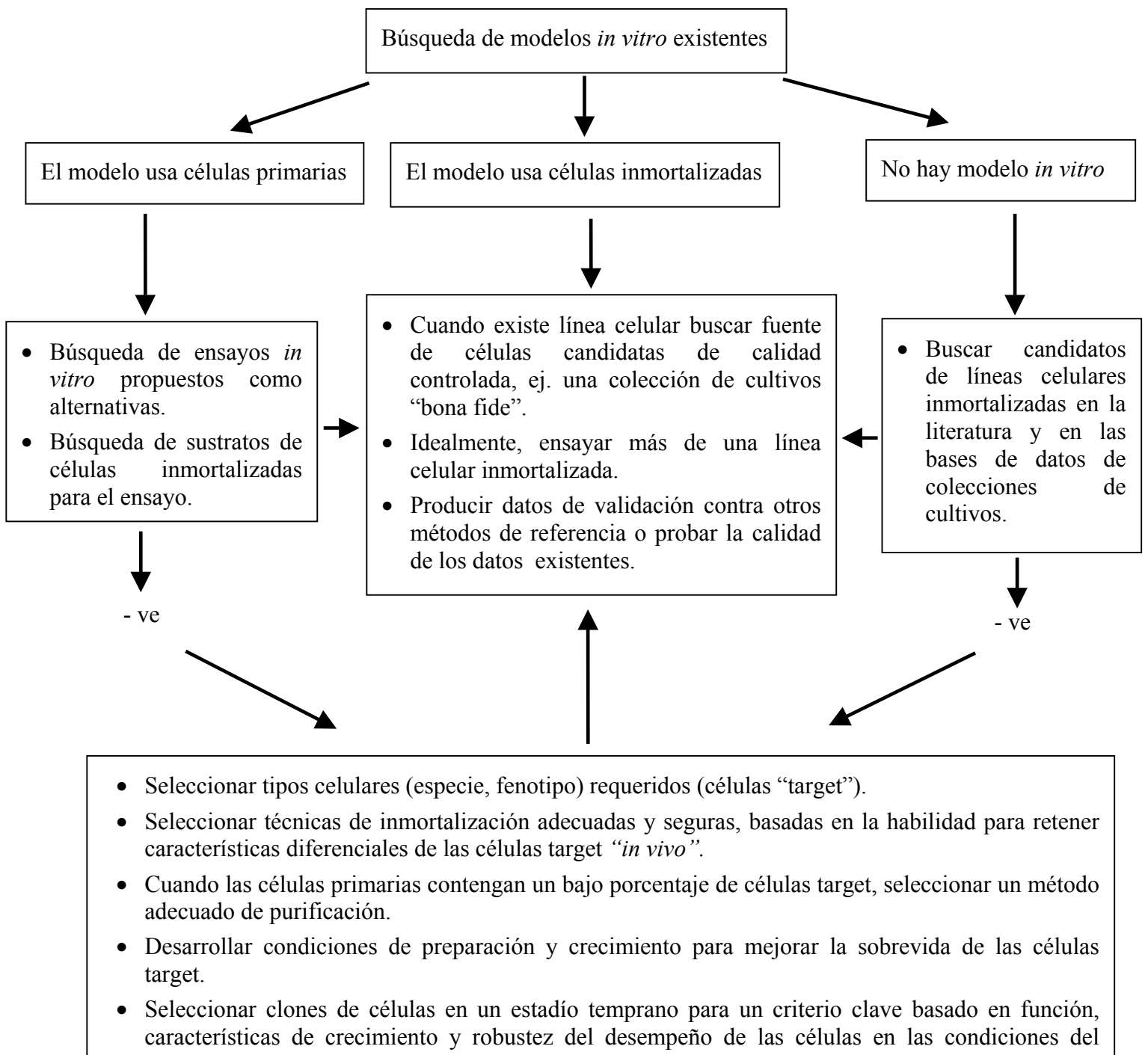
Es importante investigar la literatura y las bases de datos de colecciones de cultivos por líneas celulares candidatas apropiadas porque esto nos puede ahorrar una gran cantidad de tiempo y recursos. Sin embargo, aunque las bases de datos que existen para identificar fuentes de cultivos celulares incluyen CABRI (<http://www.cabri.org>) y WDCM (<http://www.bdt.org.br/bin21/ws92/wfcc.html>), pocos cultivos celulares primarios normales immortalizados están disponibles y a estos frecuentemente les falta fenotipo específico del tejido. En ausencia de células probables candidatas u otros ensayos *in vitro* el tema ético y práctico asociado con el uso de células primarias y cultivos de órganos implica que sería inteligente considerar un programa de immortalización.

Este proceso incorpora un número de estadios críticos que se identifican en la Fig. 1 y que se discuten a continuación.

Para producir cantidades adecuadas de células primarias es usualmente necesario desagregar muestras de tejidos para obtener una suspensión celular que pueda formar una monocapa celular en condiciones adecuadas de cultivo. El éxito y reproducibilidad de un cultivo primario depende de la fuente original del tejido, en la que especie, edad, sexo, tipo de tejido y estado de salud o enfermedad son importantes factores. La especie, edad y otras características pueden influenciar la relevancia de los datos toxicológicos obtenidos de experimentos *in vivo* y es, por lo tanto, importante asegurar que se ha seleccionado un apropiado origen de células primarias.

Figura N° 1.

Estrategia para la selección y el desarrollo de sustratos celulares para modelos *in vitro*.



Las células diferenciadas terminalmente pueden perderse en el proceso de aislamiento, mientras que células precursoras, progenitoras o “stem”, en condiciones de cultivo apropiadas, pueden sobrevivir y proliferar. La desagregación de los tejidos genera daño celular y liberación de enzimas tóxicas tales como proteasas. Muy frecuentemente es usada una combinación de desagregación física (ej.: trituración, gasa abrasiva) y digestión enzimática. Agentes quelantes tales como EDTA pueden también ser efectivos en la producción de suspensiones celulares de algunos tejidos mediante el secuestro de cationes divalentes involucrados en la adhesión célula a célula.

Normalmente son usadas enzimas como la colagenasa y la tripsina, pero enzimas adicionales pueden ser útiles (ej.: elastasa, hialuronidasa) dependiendo de la composición específica del tejido de interés. La preparación específica de la enzima puede también ser crítica, ya que la actividad biológica y la pureza (ej.: contaminación con otras enzimas) puede variar. Hay también riesgos de contaminación cuando se trata de productos de origen animal, y se ha demostrado contaminación de cultivos celulares con parvovirus porcino (Hallauer et al., 1971). Afortunadamente, hoy se puede disponer comercialmente de tripsina libre de virus porcinos. Es importante optimizar la temperatura y tiempo de incubación de una determinada solución de desagregación para lograr una suspensión de células aisladas y un alto porcentaje de viabilidad celular.

Es importante optimizar el medio de cultivo requerido para las células en el cultivo primario, pero esto no necesariamente significa la selección de condiciones de cultivo que promueven la rápida proliferación celular. El éxito de muchos intentos de immortalización depende de la presencia de un gran número de células en fase S del ciclo celular a fin de incrementar la eficiencia con la cual los vectores DNA de immortalización son incorporados al genoma. Sin embargo, la selección de células adecuadas para división rápida puede acarrear pérdida de otras características deseadas.

Existen técnicas que pueden aplicarse para el aislamiento preferencial y sobrevida de tipos celulares específicos y la eliminación o supresión de células no deseadas, por ej.: anticuerpos específicos en esferillas magnéticas (Brosterhus et al, 1999) o la inhibición de fibroblastos mediante el uso de cis-hidroxi-prolina o fenobarbitona (Kao y Prokop, 1977; Fry y Bridges, 1974).

3. TÉCNICAS DE INMORTALIZACIÓN

Los experimentos para generar nuevas células immortalizadas han empleado técnicas como la irradiación, el tratamiento con carcinógenos químicos, virus, vectores de DNA recombinante expresando oncogenes y, más recientemente, expresión de telomerasa humana. En la Tabla 1 se dan algunos ejemplos de sus características comunes. Una conclusión general a la que se puede arribar desde esta Tabla es que sólo algunas, si las hay, de estas técnicas permiten retener las funciones totalmente diferenciadas del tipo celular parental.

Sin embargo, hay estrategias más recientes que son prometedoras y utilizan vectores donde el control de la proliferación es regulado. En estos sistemas los mecanismos de regulación deben ser “ajustados” para prevenir la proliferación de células no diferenciadas cuando se aplican condiciones de diferenciación.

Tabla 1. Técnicas para la inmortalización de células animales

Técnica	Ejemplo	Características comunes de las líneas celulares
Irradiación	Irradiación gamma	Daño genómico múltiple al azar puede anular muchas características
Carcinógenos químicos	MNNG	Daño genético al azar
Virus	Epstein Barr Leucemia murina Sarcoma de Rous SV40	Frecuentemente aplicable sólo en huéspedes naturales. Fenotipo común transformado Restringido a ciertos tipos celulares
DNA recombinante	Plásmidos o vectores virales expresando proteínas transformantes como T grande de SV40 ó E1A de adenovirus	Variable retención de características decisivas

3.1. Expresión heteróloga de oncogenes

La sobre-expresión de una secuencia clonada de oncogen en células blanco es una estrategia común para interferir con el ciclo celular y promover ciclos repetidos de replicación de DNA y división celular que permita el establecimiento de una línea celular continua. Como se describe a continuación, han sido utilizados varios métodos de introducir una secuencia de DNA en el genoma de células blanco. En cada caso la secuencia de DNA deber ser expresada a un nivel apropiado y esta expresión debe ser estable durante el subcultivo serial prolongado normalmente como resultado de la integración en el genoma de la célula huésped.

La expresión intracelular del gen para antígeno grande T de SV40 fue uno de los usos más tempranos de recombinantes para la inmortalización celular (Scott et al, 1986). Este antígeno es un poderoso estimulador de la división celular, logrando esto mediante el pegado a un factor mayor de transcripción E2, permitiendo así a la célula huésped entrar en fase S y progresar en el ciclo celular.

En los primeros experimentos el antígeno T grande de SV40 era exitoso en células de humanos (Mayne et al, 1986) y de roedores (Scott et al, 1986) y, a través de los años, un variado rango de líneas celulares se ha desarrollado de esta manera (McLean, 1999).

Se ha usado también un amplio rango de otros oncogenes virales, incluyendo *myc* y *raf* (Darnborough et al, 1992; Tamai et al, 1992) Otros investigadores han utilizado las poderosas proteínas transformantes de adenovirus (E1a) y virus de papiloma Humano (E6 y E7). En algunos protocolos de inmortalización han sido utilizados vectores de expresión múltiple para co-transfectar células blanco, ya sea con oncogenes

complementarios como *H-ras* con *c-myc* ó *c-fos* (Shirata et al, 1991; McLean 1999) y la expresión de genes que suprimen la muerte celular, tal como *bcl-2*, puede ser también de utilidad.

3.1.1. Vectores plasmidicos

Ha sido descrito y revisado (Schlokot et al, 1997; Twyman y Whitalaw, 2000) un amplio panel de vectores de expresión plasmídica utilizando diferentes oncogenes virales que incorporan una variedad de promotores (ej: SV40, CMV) y marcadores de resistencia a antibióticos para la selección de las células transformadas

El mayor desafío en establecer líneas celulares con vectores Plásmidos incluye el aseguramiento de la incorporación del DNA en una forma apropiada y la obtención de una integración adecuada y estable del DNA en el genoma.

Tradicionalmente, las transfecciones estables han sido logradas usando la técnica de co-precipitación calcio fosfato, que es comúnmente usado para transfectar líneas celulares estándar como CHO (Chinese Hamster Ovary). Sin embargo, este método es inadecuado para immortalizar algunas células primarias porque las somete a condiciones tóxicas que pueden destruir la población celular blanco en un cultivo primario.

Por lo tanto, es importante establecer tiempos de tratamiento que no reduzcan significativamente la viabilidad celular. La toxicidad de los procesos de co-precipitación puede reducirse usando fosfato de estroncio en lugar de fosfato de calcio (Reddel et al, 1988). La transfección exitosa también puede ser altamente dependiente de la calidad del coprecipitado, dado que las partículas que son demasiado grandes pueden no ser tomadas por las células. Así, es importante realizar experimentos en los primeros estadios para optimizar el proceso de transfección (Jordan et al, 1996).

En general, las células que forman monocapas adherentes de células grandes y planas, es decir, que tienen un área grande de superficie, y muestran una endocitosis activa, proveen el mejor sustrato para la co-precipitación. Para células de ciertos tejidos la endocitosis puede ser inducida o mejorada suplementando al medio de cultivo con hormonas, como la tiro-estimulante para células epiteliales de tiroides. Otros medios no específicos para incrementar la eficiencia de transfección incluye shock osmótico (ej: glicerol, sucrosa), uso de polibrene para promover la interacción partícula / membrana celular y aumentar la permeabilidad de la membrana celular (ej: dimetilsulfóxido, polietilenglicol, anfotericina B) (por referencia general ver Schlokot et al, 1997).

Pese a todos los métodos para mejorar la eficiencia de la transfección, las células que se cultivan en suspensión tales como leucocitos pueden permanecer muy ineficientes en la incorporación de coprecipitados.

La transfección utilizando DNA incorporado en liposomas se ha desarrollado rápidamente en años recientes y ha demostrado ser muy exitosa. Puede usarse un rango de formulaciones lipídicas , incluyendo lípidos catiónicos, aniónicos y neutros, pero los primeros son los más frecuentemente usados en la transfección de células *in vitro* (Hug y Sleight, 1991; Lee y Huang, 1997; Maurer et al, 1999). El uso de liposomas tiene un número de ventajas para la transfección, ya que ellos son no-tóxicos y pueden ser agregados directamente en el medio de cultivo. Además ellos no tienen un límite teórico máximo para el tamaño del DNA incluido y esto es una ventaja particular con respecto a los vectores virales.

Los liposomas se forman naturalmente en las soluciones acuosas, pero esto está influenciado por el pH, la longitud de la cadena de carbonos y la saturación de la molécula de lípido. Es de utilidad conocer la eficiencia con la cual ocurre el encapsulamiento del DNA. Esto puede ser identificado mediante electroforesis en agarosa de liposomas tratados con DNAsa conteniendo DNA teñido con bromuro de etidio. La eficiencia del encapsulamiento puede mejorarse simplemente sometiendo los liposomas a ciclos de congelamiento y descongelamiento, aunque esto también incrementará el tamaño de los liposomas. La mayoría de los lípidos catiónicos son usados con fosfatidiletanolaminas insaturadas que pueden mejorar las cualidades de la fusión.

Hay un número de sistemas de transfección por liposomas disponibles comercialmente, pero es importante averiguar si los lípidos usados son apropiados para las células blanco de interés dado que la eficiencia de transfección puede estar influenciada por la formulación de lípidos. Algunos fabricantes producen kits de prueba, conteniendo diferentes preparaciones de lípidos para este propósito. La incorporación de otras moléculas (ej.: anticuerpos específicos para células, folato, transferrina, biotina) en los liposomas puede usarse para dirigir los liposomas a tipos celulares específicos y esto puede proveer métodos altamente eficientes para transfectar e immortalizar células en el futuro (ver la referencias en Hug y Sleight , 1991; Lee y Huang, 1997).

Además de los medios standard de coprecipitación y los mediados por liposomas para la transfección de células, pueden emplearse otras estrategias como electroporación (Shigekawa y Dower, 1988), y pegado de DNA con citoquinas marcadas (Wu et al, 1987; Schwarzenberger et al, 1996) y polilisina glicosilada (Erbacher et al, 1995).

El DNA plasmídico, aun desnudo, puede ser transfectado a la célula, pero queda expuesto al daño de las enzimas celulares y puede no sobrevivir intacto. Por ello, los tratamientos que promueven el acceso del plásmido al genoma, como butirato de sodio, pueden mejorar la eficiencia y velocidad de la integración.

3.1.2. Vectores virales

Un número de virus transformantes pueden ser usados en su estado nativo para generar líneas celulares continuas. El virus de Epstein Barr es usado rutinariamente para la preparación de líneas celulares B- linfoblastoides (Stacey y Doyle, 2000) y hay otros ejemplos bien conocidos como la transformación de células epiteliales por virus de papiloma y transformación de linfocitos T humanos con virus linfotrópicos humanos (Popovic et al, 1983). Sin embargo, el fenotipo transformado puede no ser conveniente para los modelos toxicológicos *in vitro* y hay un riesgo de expresión persistente de virus patogénicos en células immortalizadas.

Se han desarrollado un panel de vectores virales recombinantes para sobreexpresión de genes para promover la proliferación celular y la sobrevivencia, y éstos son revisados en otras publicaciones (Sandig et al, 1997; Twyman y Whitelaw, 2000; Doyle y Griffiths, 2000). En la immortalización de células primarias los vectores virales tienen la ventaja de adoptar mecanismos naturales de infección que proveen baja toxicidad al proceso de

transfección. No obstante, los vectores virales pueden también imponer la especie y tropismo de tejido del virus original, y las limitaciones al tamaño del DNA incorporado puede limitar sus posibilidades de aplicaciones.

3.1.3. Control condicional de la proliferación celular

A fin de producir un sistema de cultivo celular que reproduzca las respuesta *in vivo* es importante que las células tengan características diferenciadas. Dado que el estado diferenciado y la rápida proliferación celular son frecuentemente excluyentes, se ha empleado un número de mecanismos moleculares para regular la proliferación celular y permitir un estado más diferenciado. Han sido empleadas diversas estrategias para el control de la expresión de construcciones recombinantes en células de mamíferos, incluyendo promotores inducidos por metalotioneina, expresión de proteína ligada a shock térmico (review ver Gingrich y Roder, 1998).

Otro medio común de controlar la proliferación celular es la expresión de variantes temperatura sensibles del antígeno T grande de SV40, en el cual la proliferación solamente ocurre a la temperatura permisiva de 33 ° C (ej.: Allen et al, 2000). También han sido desarrollados receptores de factor de crecimiento modificados para responder solamente a hormonas naturales análogas agregadas al medio de cultivo (Littlewood et al, 1995).

Se encuentra disponibles comercialmente un rango de sistemas de expresión inducibles para células de mamíferos (ver Tabla 2 y Gingrich y Roder, 1998). Sin embargo, es importante obtener información sobre el grado de reproducibilidad que puede ser logrado en la regulación, ya que una proporción de células transfectadas en el cultivo pueden escapar a la regulación y comprometer el valor del sistema.

Los ratones transgénicos portadores de genes inmortalizantes, tales como “inmortalmouse” (Holley y Lawlor, 1997)son también una fuente potencial de nuevas células condicionalmente inmortalizadas.

Tabla 2. Ejemplos de sistemas comercialmente disponibles para inducir la expresión en mamíferos

Sistema de expresión	Base molecular	Proveedor
“Tet on”/ “Tet of”	Tetraciclina pegada a la expresión de la construcción causante de “up” o “down” regulación cuantitativa de la expresión	Clontech
“Sistema ecdisona inducible”	Expresión inducida por ecdisona en respuesta a la inducción por muristerona (reconocida por la regulación ajustada y la baja expresión de fondo)	Invitrogen
“LacSwith II”	Operón Lac controla la expresión	Stratagene

La generación de líneas celulares desde células que sufrirán diferenciación, tales como las células stem, presentan nuevos desafíos para la regulación de la proliferación celular, ya que los eventos involucrados en la diferenciación pueden conducir al silenciamiento de los sistemas de expresión. Para sistemas de células hematopoyéticas han sido desarrollados nuevos vectores de expresión, con secuencias de control LTR modificadas que, se ha reportado, no son silenciadas por la diferenciación (Hawley et al, 1996).

3.2. Expresión ectópica de telomerasas

La actividad de telomerasa es un elemento importante en el mantenimiento de la estructura cromosómica en células humanas. Esta comprende una secuencia de ARN (hTR) que pega repeticiones de DNA telomérico y un componente de transcriptasa reversa (hTERT). Mientras la complejidad de la función telomerasa normal no ha sido aún totalmente entendida, se sabe está asociada con la proliferación anormal de células cancerosas y la inmortalización de células humanas (Bryan y Reddel, 1997; Vaziri y Bechimol, 1999). La transfección del gen hTERT en células primarias normales ha producido líneas celulares de larga vida que, a diferencia de las frecuentemente producidas mediante transfección con oncogenes, son estables y retienen características clave de células primarias (Morales et al, 1999). Esta estrategia ha sido exitosamente aplicada a fibroblastos de piel humana (Vaziri y Bechimol, 1998), células endoteliales (Bodmar et al, 1998) y células endoteliales retinales pigmentadas (Yang et al, 1999).

También ha sido demostrado que la expresión ectópica de hTERT mejora el tiempo de vida y la estabilidad de células inmortalizadas mediante el uso de oncogenes virales.

Sin embargo, este éxito no parece ser directamente transferible a células murinas usando TERT de ratón (mTERT) y se requerirá más investigación básica sobre la naturaleza de la telomerasa en otras especies antes de que esta estrategia sea ampliamente aplicable. De todos modos, la provisión de líneas celulares humanas estables, con características consistentes con células primarias tiene implicaciones muy positivas para el desarrollo de ensayos para toxicología *in vitro* más exactos y relevantes.

3.3. Control antisentido de proliferación celular

El producto del gen retinoblastoma (Rb) y p53 son componentes clave de la maquinaria celular que regula el proceso a través del ciclo celular desde G₀ (estado quiescente) a la fase S (replicación de DNA precedente a la división celular) (Herwig y Strauss, 1997). La interferencia con esas proteínas puede liberar a la célula desde el “punto de restricción” normal G₀/ fase-S y permitir la desregulación de la proliferación celular. Esta estrategia parece haber sido aplicada exitosamente para el desarrollo de hepatocitos humanos inmortalizados usando construcciones antisentido contra Rb y p53 (Werner et al, 1999). Al prevenir la sobre-expresión de oncogenes puede que esta estrategia evite los efectos de transformación asociados a los métodos más tradicionales de inmortalización celular y ofrece un medio potencialmente importante de obtener modelos útiles para toxicología *in vitro*.

4. CONSIDERACIONES SOBRE SEGURIDAD

4.1. Cultivos Celulares

El hecho de que las células primarias y las líneas celulares son capaces de propagar virus contaminantes significa que ellas deben ser siempre consideradas como potencialmente infecciosas. Los riesgos potenciales representados por los cultivos primarios pueden ser evitados mediante la obtención de las células **únicamente** de fuentes (donantes) que han sido demostrados libres de patógenos clave. Estos serán generalmente identificados considerándolos contaminantes más probables en el tejido, la especie de origen y fuente de células primarias. Para tejidos humanos, obviamente los virus transmitidos por sangre, como hepatitis B y C, HIV, HTLV y citomegalovirus son los de mayor interés. Sin embargo, es importante reconocer que cualquier estimación de riesgo debe también considerar situaciones donde infecciones naturales de animales pueden causar serias afecciones en humanos (Ej.: enfermedades zoonóticas). En estudios con colonias de cría de animales, células tumorales mantenidas *in vivo* y ascitis inmunes han demostrado la presencia de virus de roedores. Estos incluyen Rheovirus 3, virus de la Coriomeningitis Linfocitaria y Hantavirus, todos los cuales causan infecciones en humanos que pueden comprometer la vida.

4.2. Regulaciones GMO

Cualquier organismo (NB: excluyendo humanos) sometido a modificación genética que no ocurriría naturalmente, es considerado un GMO (Genetically Modified Organism). Esto incluye a cualquier célula animal sujeta a modificaciones de DNA recombinante, ya sea mediada por plásmidos, virus, u otros vectores. Es importante reconocer que no es sólo el laboratorio que produce construcciones recombinantes que debe considerar los temas de seguridad relativos a los GMOs. El uso y almacenamiento de tales organismos también requiere la estimación de riesgos y la adopción de adecuadas medidas de control.

Por razones de seguridad y estabilidad genética es preferido que las secuencias virales sean modificadas para prevenir la recuperación de virus infeccioso viable en las células inmortalizadas resultantes. Esto puede lograrse expresando la construcción de virus en una línea celular que exprese un gen complementario esencial para la producción de virus viable. Un ejemplo típico de esta estrategia es el grupo de vectores adenovirales deficientes E1A (proteína transformante) crecido en líneas celulares expresando E1A.

Una aproximación posterior comúnmente usada para vectores virales es el aislamiento de genes virales clave en al menos dos regiones separadas del paquete genómico de la línea celular. Esto reduce el riesgo de recombinación que pueda originar virus viable la eliminación del paquete de secuencias virales nativas de esos genes virales clave reducirá aún más el riesgo de que pueda ocurrir un re-empaquetamiento en la forma de un nuevo virus recombinante.

Información general adicional para tratar con células animales recombinantes es dada por MacDonald (1998). Información detallada actualizada sobre regulaciones nacionales puede encontrarse en sitios web de un número de países, incluyendo:

Alemania (<http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ALLGSTELL/STELL:HTM>)

Reino Unido (<http://www.open.gov.uk/hse/hthdir/comindex.htm>)

EEUU (<http://www.cdc.gov/od/osh/biosfty/bmb14/bmb14toc.htm>)

5. CARACTERIZACION Y VALIDACIÓN DE CELULAS INMORTALIZADAS

5.1. Provisión de un archivo confiable de células

Es vital que se establezca en un estadio temprano , un stock viable de células criopreservadas para proveer seguridad contra la pérdida accidental u otros eventos adversos durante la manipulación *in vitro*. También resulta de decisiva importancia el mantener completa documentación sobre condiciones y medios de cultivo, así como de cualquier caracterización (citogenética, investigación molecular, morfología, funciones bioquímicas, productos secretados, marcadores de superficie) realizada.

Un pasaje temprano del stock de células debe someterse también a controles de calidad fundamentales, incluyendo viabilidad de las células criopreservadas, esterilidad (presencia de bacterias y hongos, presencia de micoplasmas) e identidad.

5.2. Evitar la contaminación de nuevas líneas celulares

Diversas contaminaciones pueden generarse en el entorno del laboratorio y muchos trabajadores usan rutinariamente antibióticos para proteger a los cultivos de este riesgo. Sin embargo, el uso rutinario de antibióticos puede conducir al desarrollo de microorganismos resistentes o puede resultar en la supresión pero no la eliminación de ciertos contaminantes, tales como micoplasmas. Tal contaminación puede sobrevivir en bajos niveles para reaparecer y generar problemas en etapas posteriores. Por lo tanto es prudente mantener al menos una minoría de frascos de cultivo de cada tipo de célula libre de antibióticos de modo que cualquier contaminación será inmediatamente evidente.

Algunos reactivos para cultivos celulares como suero, tripsina y otros de origen animal, son conocidamente fuentes de contaminación con virus y, posiblemente, micoplasmas. Tales reactivos deben ser provistos por fabricantes de reconocida calidad, que pueden proveer evidencia de la calidad de sus productos en la forma de certificados de análisis que documenten los resultados de las pruebas de control para microorganismos.

Actualmente es impráctico intentar probar los productos para todos los tipos de potenciales contaminantes virales. Los proveedores deben estar en condiciones de reportar la fuente y el país de origen y esto puede ser de ayuda para excluir la presencia de ciertos virus. El suero fetal bovino obtenido de Australia y el de Nueva Zelandia son considerados de particular bajo riesgo de contaminación con virus patogénicos. Las compañías que proveen tales sueros deben proveer documentos de trazabilidad que certifiquen el origen del suero. El uso de fuentes aceptables de suero puede ser crítico

para la colaboración científica cuando las células son transferidas entre laboratorios. Por ejemplo, EEUU en particular requiere evidencia del país de origen del suero usado para crecer cualquier célula enviada a ese país. Los laboratorios que reciben líneas celulares de colegas deben solicitar evidencia de la calidad de las células para evitar problemas que pueden resultar en pérdida de tiempo y recursos, si las células aparecen más tarde con evidencias de contaminación (Stacey et al, 2000).

5.3. Caracterización de nuevas células inmortalizadas

La cuidadosa caracterización y documentación de las características morfológicas y otros atributos (cariología, marcadores inmunocitoquímicos de superficie, expresión de enzimas, funciones bioquímicas) de una nueva línea celular en un temprano estadio serán útiles para comparar con datos producidos en fecha posterior o en otros laboratorios.

Las características de crecimiento de las líneas pueden variar considerablemente. Los técnicos que manipulan una nueva línea celular inmortalizada rutinariamente se familiarizarán rápidamente con sus características particulares. De todos modos, puede ser muy valioso establecer características de crecimiento con un criterio científico mediante la preparación de curvas de crecimiento y la realización de ensayos de eficiencia de pegado (Freshney, 1994). Tal información es valiosa para establecer densidades de siembra apropiadas y frecuencia de subcultivos para optimizar la expansión del cultivo.

No puede asumirse que una nueva línea celular inmortalizada continuará replicándose indefinidamente. Algunos cultivos puede alcanzar un valioso tiempo de vida prolongado comparados a los cultivos primarios pero ellos no son necesariamente inmortales. Además, muchas líneas celulares son proclives a la inestabilidad durante pasajes por largo tiempo. Así, un importante componente en la caracterización de un nuevo cultivo “inmortalizado” es la demostración de la capacidad del cultivo para replicarse reproduciblemente durante el pasaje serial por largo tiempo sin pérdida de características críticas para el uso al que está destinado. Durante este proceso debe determinarse el número de células viables (típicamente por tinción de exclusión con Azul Tripán) para permitir el cálculo de las duplicaciones de población alcanzadas durante el cultivo (Freshney, 1994). La sola anotación de los números de pasajes no es satisfactoria dado que las duplicaciones de células para cada pasaje pueden variar y esta variación puede ser particularmente marcada entre diferentes laboratorios y diferentes regímenes de pasajes.

6. RESUMEN

El conocimiento de las células blanco es fundamental para maximizar la eficiencia en los intentos de immortalización de tipos celulares específicos. Para optimizar un sistema de cultivo celular primario es también importante promover la supervivencia de la población de células *target*. Otros factores importantes que pueden influenciar el éxito en la obtención de células immortalizadas incluyen la toxicidad y la eficiencia del procedimiento de immortalización. Estos pueden ser ensayados experimentalmente y, si es necesario, se pueden desarrollar técnicas para purificar la población de células *target*.

Cuando las líneas celulares han sido establecidas es vital probarlas en un temprano estadio para las características científicas y prácticas, así como también determinar su estabilidad y tiempo de vida. Más aun, la caracterización temprana de la autenticidad de la línea celular (características genéticas, especie de origen) y las pruebas de control de calidad evitará la pérdida de tiempo y recursos si ocurriese una contaminación con microorganismos o por otra línea celular.

Establecer un programa de immortalización es un emprendimiento serio que debería solamente ser considerado cuando no hay disponibles líneas celulares continuas candidatas. Sin embargo, nuevos sustratos, valiosos para la toxicología *in vitro*, pueden ser surgir de nuevas estrategias para modificar la biología de las células para darles extendido tiempo de vida, mientras retienen las características de células diferenciadas *in vivo*.

REFERENCIAS

- Abu-Absi, N.R. (2000) Cell Cycle Events and Cell Cycle Dependent Processes: Animal Cell technology, in RE Spier (ed), *Encyclopedia of Cell technology*, Wiley-Interscience, New York, 320-336.
- Allen, K.J., Reyes, R., Demmler, K., Mercer, J.F., Williamson, R. and Whitehead, R.H. (2000) Conditionally immortalized mouse hepatocytes for use in liver gene therapy, *J. Gastroenterol.Hepatol.* **15**, 1325-1332.
- Bodmar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C-P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349-352.
- Brosterhus, H., Brings, S., Leyendeckers, H., Manz, R.A., Miltenyi, S., Radbruch, A., Assenmacher, M., Schmitz, J. (1999) Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion, *Eur. J. Immunol.* **29**, 4053-4039.
- Bryan, T.M. and Reddel, R.R. (1997) Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalized human cells. *Eur.J.Can.* **33**, 767-773.
- Darnbrough, C., Slater, S., Vass, M. and MacDonald, C. (1992) Immortalization of murine primary spleen cells by v-myc, v-ras, and v-raf, *Exp. Cell Res.* **201**, 273-283.
- Doyle, A. and Griffiths, J.B. (2000) *Cell and Tissue Culture for Medical Research*, John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Erbacher, P. Roche, A.C., Monsigny, M. and Midoux, P. (1995) Glycosylated polylysine/DNA complexes: gene transfer efficiencies in relation with the size and sugar substitution level of glycosylated polylysines and with the plasmid size. *Bioconjugate Chem.* **6**, 401-410.
- Freshney, I.R. (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (Third Edition) Wiley-Liss, New York.

- Fry, J. and Bridges, J.W. (1979) The effect of phenobarbitone on adult rat liver cells and primary cell lines, *Toxicol. Lett.* **4**, 295-301.
- Gingrich, J.R. and Roder, J. (1998) Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice, *Ann. Rev. Neurosci.* **21**, 377-405.
- Hallauer, C., Kronauer, G. and Siegl, G. (1971) Parvovirus contaminants of permanent human cell lines virus isolation from 1960-1970, *Arch. Gesamte Virusforsch.* **35**, 80-90.
- Hawley, R.G., Hawley, T.S., Fong A.Z.C., Quinto, C., Collins, M., Leonard, J.P. and Goldman, S.J. (1996) Thrombopoietic potential and serial repopulating ability of murine hematopoietic stem cells constitutively expressing interleukin 11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10297-10302.
- Herwig, S. and Strauss, M. (1997) The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis, *Eur. J. Biochem.* **246**, 581-601.
- Holley, M.C. and Lawlor, P.W. (1997) Production of conditionally immortalised cell lines from a transgenic mouse, *Audiol. Neurootol.* **2**, 25-35.
- Hug, P. and Sleight, R.G. (1991) Liposomes for the transformation of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1097**, 1-17.
- Jordan, M., Shallhorn, A. and Wurm, F.M. (1996) Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res.* **24**, 596-601
- Kao, W-Y and Prockop, D.I. (1977) Proline analogue removes fibroblasts from cultured mixed cell populations. *Nature* **266**, 63-64.
- Lee, R.J. and Huang, L. (1997) Lipidic vector systems for gene transfer. *Crit. Rev. in Therapeutic Drug Carrier Systems* **14**, 173-206.
- Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G. and Evan, G. (1995) A modified receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins, *Nucleic Acids Res.* **23**, 1686-1690.
- MacDonald, C. (1998) Safety aspects of genetic modification procedures, in Stacey, GN, Doyle, A, Hambleton, P (eds.) Safety Considerations in Cell and Tissue Culture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 189-204.
- Maurer, N., Mori, A., Palmer, L., Monck, M.A., Mok, K.W.C., Mui, B., Akhong, Q.F. and Cullis, P.R. (1999) Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs. *Mol. Memb. Biol.* **16**, 129- 140.
- Mayne, L.V., Priestley, A., James, M.R. and Burke, J.F. (1986) Efficient immortalization and morphological transformation of human fibroblasts by transfection with SV40 DNA linked to a dominant marker, *Exp. Cell Res.* **162**, 530-538.
- McLean J.S. (1999) Immortalization strategies for mammalian cells, in Jenkins (ed), *Methods in Biotechnology*, Vol. 8 *Animal Cell Biotechnology*, Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp.61-72.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.A. and Shay, J.W. (1999) Absence of cancer associated changes in human fibroblasts immortalised with telomerase. *Nature Genetics* **21**, 115-118.
- Parkinson, E.K., Newbold, R.F. and Keith, W.N. (1997) The genetic basis of human keratinocyte immortalization in squamous cell carcinoma development: the role of telomerase reactivation, *Eur. J. Can.* **33**, 727-734.
- Popovic, M., Lange-Wantzin, G., Sarin, P.S., Mann, D. and Gallo, R.C. (1983) Transformation of umbilical cord blood T cells by human T-cell leukaemia/lymphoma virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 5402-5406.
- Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I., McMenamin, M.G., Lechner, J.F., Su, R.T., Brash, D.E., Park, J.B., Rhim, J.S. and Harris, C.C. (1988) Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection by strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* **48**, 1904-1909.

- Sandig, V., Lieber, A. and Strauss, M. (1997) *Vectors for gene transfer and expression in animal cells*, in *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Product*, Walter de Gruyter, Berlin/New York, pp. 65-85.
- Schlokot, U., Himmelspach, M., Falkner, F.G., and Dorner, F. (1997) *Permanent gene expression in mammalian cells*, in *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*, Walter de Gruyter, Berlin/New York, pp. 37-52.
- Schwarzenberger, P., Spence, S.E., Gooya, J.M., Michiel, D., Curiel, D.T., Ruscetti, F.W. and Keller, J.R. (1996) Targeted gene transfer to human haematopoietic progenitor cell lines through the c-kit receptor. *Blood* **87**, 472-478.
- Scott, D.M., MacDonald, C., Brzeski, H. and Kinne, R. (1986) Maintenance and expression of differentiated function of kidney cells following transformation by SV40 early region DNA. *Exp. Cell Res.* **166**, 391-398.
- Shirata, S., Truyak, K., Mori, T., Seki, K., Ohashi, H., Tachibana, H. and Murakami, H. (1991) Genetic enhancement of protein productivity of animal cells by oncogene, in K. Sasaki and K. Ikura (eds), *Animal Cell Culture and Production of Biologicals*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp259- 266.
- Shigekawa, K. and Dower, W.J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**, 742-751.
- Stacey, G.N. and Doyle, A. (2000) Cell Banks: A Service to Animal Cell Technology, in R.E. Spier *Encyclopedia of Cell Technology*., Wiley-Interscience, New York, pp293-320.
- Stacey, G.N., Masters, J.R., MacLeod, R.A.F., Drexler, H. and Freshney, I.R. (2000) Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now. *Nature* **403**, 356.
- Tamai, T., Sato, N., Kimura, S., Shirahata, S. and Murakami, H. (1992) immortalization of flatfish (*Paralichthys olivaceus*) leukocytes by oncogene transfection, in R.E. Spier, J.B. Griffiths and C. MacDonald (eds.), *Animal Cell Biotechnology: Developments, Processes and Products*, Butterworth- Heinemann, Oxford, UK, pp. 29-31.
- Twyman, R.M. and Whitelaw, B (2000) *Genetic Engineering: Animal Cell Technology*, in R.E.Spier (ed.), *Encyclopedia of Cell technology*, Wiley-Interscience, New York, pp. 737-819.
- United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research *Ad Hoc* Working Party (1999) UKCCCR Guidelines for the Use of Cell Lines in Cancer Research. UKCCCR, PO Box 123, Lincoln's Inn Fields, London.
- Vaziri, H.F. and Bechimol, S. (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* **8**, 279-282.
- Vaziri, H.F. and Bechimol, S. (1999) Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/Rb and expression of telomerase. *Oncogene* **18**, 7676-7680.
- Werner, A., Duvar, S., Muthing J., Bunttemeyer, H., Kahmann, U., Lunsdorf, H. and Lehmann, J. (1999) Cultivation and characterization of a new immortalised human hepatocyte cell line, Hep Z, for use in an artificial liver support system, *Ann, NY Acad. Sci.* **875**, 364-368.
- Wu, G.Y. and Wu, C.H. (1987) Receptor mediated *in vitro* gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J. Biol. Chem.* **262**, 4429-4432.
- Yang, J., Chang, E., Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chui, C-P. and Herron, G.S. (1999) Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 26141-26148.

SERVICIOS OFRECIDOS POR ABAC

1- Líneas celulares

La ABAC ofrece cada una de las líneas especificadas seguidamente en forma de ampollas con células congeladas o en botella descartable 1 T5 (superficie de trabajo de 75 cm²).

Líneas disponibles en INEVIH

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
BHK-21	Riñon de hamster dorado	Hamster	Monocapa de fibroblastos	ATCC
EHD-K1	Ovario de hamster chino	Hamster chino	Monocapa epitelial	ATCC
MRC-5	Pulmon fetal humano (diploide)	Hombre	Monocapa de fibroblastos	ATCC
WI38	Amnion humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Hep-2	Carcinoma humano (epitelial)	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Varo C-76	Riñon de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Varo E-6	Riñon de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
L-929	Tejido conectivo de raton	Raton	Monocapa epitelial	ATCC
MDCK	Riñon bovino	Vaca	Monocapa epitelial	ATCC
RK13	Riñon de conejo	Conejo	Monocapa epitelial	ATCC
DFK	Riñon de gato	Gato	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Hela	Carcinoma de cervix humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
RAJ1	Linfoma de Burkitt humano	Hombre	Linfoblastos en suspension	ATCC
HEp4	Melanoma humano	Hombre		ARGENTINA
T24	Carcinoma de vejiga humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
E. Derm	Dermis de caballo	Caballo	Monocapa de fibroblastos	ATCC
3T3 L1	Embrión de raton	Raton	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Mc'Doy	Células de raton	Raton	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Sarcoma 180	Sarcoma de raton Swiss Webster	Raton		ATCC
BT	Células de cometa nasal bovino (Bovina Turbinata)	Vaca		ATCC
EBR	Traquea de embrión bovino	Vaca	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Dros G6/36	Larva de mosquito Aedes albopictus	Mosquito		ATCC
A-72	Tumor canino	Rato		ATCC
A-549	Carcinoma de pulmón	Hombre		ATCC
+ 3T3	Embrión de raton	Raton	Monocapa de fibroblastos	
SK-MEL-28	Melanoma maligno humano	Hombre		ATCC
CV-1	Fibroblastos de riñon	Mono		ATCC

Líneas disponibles en INTA:

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
PK-15	Riñon porcino	Cerdo	Monocapa epitelial	ATCC
MDCK	Riñon canino	Rato	Monocapa epitelial	ATCC

Líneas aún no disponibles, que serán incorporadas para su distribución en un futuro próximo:

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
C32TG	Melanoma amelanótico humano	Hombre		ATCC
P3HR1	Linfoblastos humanos derivados de Linfoma de Burkitt	Hombre		ATCC
Mosquito	Larva Aedes albopictus	Mosquito	Monocapa epitelial	ATCC
D-17	Sarcoma osteogénico de perro	Perro	Monocapa epitelial	ATCC
Y-1	Epitelio tumor adrenal	Ratón		ATCC
SF9	Ovario	Spodoptera frugiperda		ATCC
SL-29	Embrión	Pollo		ATCC
MDOK	Riñón	Ovino		ATCC

Aranceles:

No socios de ABAC: U\$s 90 o su equivalente en \$, con agregado de gastos de envío.

Socios de ABAC: descuento de 1/3 de la cuota societaria sobre el arancel estipulado para no socios

Los pagos se efectuarán contra entrega cuando las líneas celulares se retiren personalmente del lugar de distribución. En caso de ser requerido el envío postal, el material será despachado aproximadamente 72 horas luego de recibida la suma total. Esta será abonada por cheque o giro postal extendido a nombre de **Asociación Banco Argentino de Celulas**.

Por solicitud de líneas celulares en depósito en el INEVH dirigirse a:

Dra. Ana María Ambrosio
Instituto Nacional de
Enfermedades Virales Humanas (INEVH)
Monteagudo 2510
2700 Pergamino (Provincia de Buenos Aires)
E-Mail: anaambrosio@hotmail.com - Dra. Ambrosio
Tel.: (02477) 4 29712 / 4 29713/ 4 29714
Fax.: (02477) 4 33045

Por solicitud de líneas celulares en depósito en el INTA dirigirse a:

Dr. Osvaldo Zabal
INTA Castelar
C.C. 77
1708 Morón (Provincia de Buenos Aires)
E-Mail: ozabal@cicv.inta.gov.ar - Dr. Osvaldo Zabal
Tel.: 4 621-1447/1278 int. 121
Fax: 4 621-1743

2- Control de micoplasmas en muestras de células*

El control de micoplasmas se realiza en muestras de células mediante la técnica de Chen, que consiste en la tinción del ADN con bis Benzimida (Hoechst 33258).

Aranceles:

No socios de la ABAC: U\$s 30 o su equivalente en \$, con agregado de gastos de envío.

Socios de ABAC: descuento de 1/3 de la cuota societaria sobre el arancel estipulado para no socios

Para coordinar el envío de muestras los interesados deberán contactarse con la Dra. Ambrosio por carta, telefónicamente o por Fax o e-mail.

*Chen TR In situ demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain.

Exp. Cell Res. 104: 255-262, 1977

3-DEPOSITO DE AMPOLLAS EN NITROGENO LIQUIDO:

Se recuerda que se encuentra a disposición de la comunidad científica la posibilidad de conservar réplicas de sus ampollas en tanques de nitrógeno líquido, asegurando así el resguardo de líneas valiosas. **El depósito de ampollas con células congeladas en nitrógeno líquido** tiene un **arancel anual de U\$s 50 por caña**, conteniendo 6 ampollas, siendo responsabilidad de la ABAC la custodia de los materiales en depósito y el mantenimiento del frío. Este servicio no involucra ningún tipo de control de calidad ni manipulación alguna de las líneas celulares en depósito.

Cada estudio sobre el material depositado se realizará a requerimiento específico del interesado, contra el pago de un arancel adicional. Los Socios de ABAC gozan de 1/3 de descuento de la cuota societaria sobre estos aranceles.

4- MANUAL DE ATCC:

La Comisión Directiva de la ABAC desea poner en conocimiento de sus asociados y a los usuarios de células cultivadas en general, que se encuentra dis-

ponible la versión en español de la publicación del American Type Culture Collection (ATCC):

ATCC - Métodos de Control de Calidad para Líneas Celulares - Edición 1992. Traducción ABAC

El costo de cada ejemplar es de treinta dólares (U\$s 30, o su equivalente en pesos) más los gastos de envío. Las órdenes de compra deberán remitirse a los destinos detallados en referencia a los servicios de la ABAC.

Informes y Venta

abac_informes@yahoo.com.ar

Se recuerda a los Sres. Asociados de ABAC que para poder acceder al beneficio de **descuentos en servicios o adquisición** de células, **DEBERÁN TENER LA CUOTA AL DÍA, AL 31 DE JULIO DE CADA AÑO (fecha de cierre del ejercicio económico).**

Desde ya, agradecemos su colaboración.

CUOTA SOCIETARIA:

SOCIOS	ARANCEL ANUAL
INDIVIDUALES	\$ 30
INSTITUCIONALES	\$ 100
COOPERADORES	\$ 200

Los pagos se realizarán mediante:

1.- Giro postal a nombre de: Dra. Ana María Ambrosio - ABAC

INEVH - Monteagudo 2510 - Código Postal 2700, Pergamino

2.- Por medio de depósito en cualquier sucursal del Banco Francés, en cuenta:

ASOCIACION BANCO ARGENTINO DE CELULAS - N° de Cuenta Corriente en Pesos: 106-3584/5

Enviar talón por correo postal simple a:

ABAC, Julián Álvarez 1218 (C1414DRZ), Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

El recibo será remitido por correo.

Se convoca a los Sres. Asociados que adeuden las cuotas societarias correspondientes a dos o más años, a que regularicen su situación, hasta el 31 de julio del corriente. A partir de esa fecha serán dados de baja, acorde al artículo XVII del Estatuto vigente.

ABAC en su nueva sede dispone de espacio para la realización de Conferencias.

Los interesados pueden solicitar información sobre condiciones y precios, comunicándose a:

abac_informes@yahoo.com.ar