

BOLETIN TRIMESTRAL ABAC
Nº 54

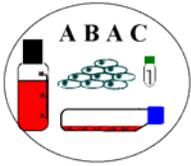
Junio de 2003

**ASOCIACION BANCO
ARGENTINO DE CELULAS**

Pers. Jur. N°1.530.806
17 años de actividad

INDICE

- 1 ANUNCIOS**
Curso Teórico - Práctico
- 2 - 8 ARTÍCULO**
Clonación en Bovinos
Daniel F Salamone y Claudio B Santos
- 9 - 12 SERVICIOS ABAC**



Asociación Banco Argentino de Células

GARANTIA DE CALIDAD EN CULTIVOS CELULARES

Módulo III EQUIPOS e INSTRUMENTOS : VALIDACIONES

Fecha octubre 2003 de 9:00 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**

Clonación en Bovinos

Daniel F Salamone y Claudio B Santos

El presente artículo tiene como objetivo describir los resultados preliminares de clonación y transgénesis bovina parcialmente publicados recientemente como resumen (Salamone et al 2003). En primer término se mencionará algunos de los aspectos generales de la clonación bovina, para una revisión detallada recomendamos artículos de Renard et al., 2002 y Dinnyés et al., 2002. El principio básico del *transplante* o la *transferencia nuclear* consiste en remover el núcleo de un ovocito maduro no fertilizado (ovoplasto recipiente) y transferirle un núcleo o una célula entera (núcleo o célula donante).

Las células somáticas se reproducen *in vitro* con gran facilidad y como toda célula diploide no reproductiva de un individuo, tiene la misma información genética; por transplante nuclear teóricamente se pueden producir tantos animales idénticos como se deseen. Este grupo de animales idénticos se denomina *clon* y el procedimiento para generarlos *clonación*.

La extracción del núcleo del ovocito se realiza generalmente por micro-manipulación y aspiración con pipetas de vidrio, controladas por equipos de movimiento de precisión denominados micromanipuladores. El núcleo del ovocito madurado *in vitro* y no fertilizado, normalmente se detiene luego de la primera división meiótica en el estadio de metafase II, hasta el momento de ser fertilizado por un espermatozoide. Luego de la fertilización será el espermatozoide mediante un proceso llamado "*activación*" el que inicia una

serie de sucesivas divisiones celulares. Con las técnicas más difundidas de clonación la activación debe ser realizada artificialmente por la aplicación de diversos métodos químicos o físicos.

La tecnología básica para clonación por transplante nuclear en mamíferos fue desarrollada en los años 80 usando como donante células de embriones (blastómeros) de ratón, pero los resultados en esta especie fueron desalentadores. Sin embargo, Willadsen en 1986, produjo los primeros corderos clonados usando como donante blastómeros de embriones tempranos. Un año después Robl *et al.*, 1987 produjeron los primeros terneros clonados con el mismo tipo de células.

La técnica de clonado con células embrionarias no logró tener gran aceptación debido a numerosos factores que llevaron a los investigadores y profesionales no la implementaran. Entre estos factores se encuentra el hecho que se debía trabajar con células embrionarias cuyo mérito genético es desconocido, además los embriones tempranos tienen un reducido número de células. Sumado a esto las bajas tasas de preñez y dificultades en el parto producidas por el excesivo peso de las crías desalentaron la aplicación comercial de la técnica. El entusiasmo inicial fue disminuyendo y prácticamente ninguna compañía estaba usándola comercialmente hasta 1997. En este año Wilmut *et al.* (1997) publicaron el nacimiento de la oveja Dolly la cual fue producida por clonación de células provenientes de un animal adulto. Como inicialmente los resultados de clonación con células donantes adultas eran poco

eficientes, se considero entonces la posibilidad de usar células fetales. Con estas como donantes los grupos del Instituto de Roslin (Schnieke *et al.*, 1997) y de la Universidad de Massachusetts (Cibelli *et al.*, 1998) produjeron los primeros ovinos y bovinos respectivamente clonados y transgénicos; demostrándose así que la técnica de trasplante nuclear es extremadamente eficiente para producir animales transgénicos. Las células fetales pueden multiplicarse *in vitro* por períodos más prolongados que las adultas lo que permite realizar modificaciones genéticas con mayor facilidad y además llega a término y sobrevive luego del nacimiento un mayor número de clones (Heyman *et al.* 2002).

Wakayama *et al.*, 1998 repitieron los resultados de clonación con animales adultos y produjeron numerosos ratones clonados, utilizando como donantes células del cúmulus. Investigadores japoneses tuvieron aun resultados más alentadores dado que produjeron varios terneras clonadas a partir de adultos usando también células del cúmulus (Kato *et al.*, 1999). Dado el tipo de célula donante utilizada nadie había producido machos adultos por clonación hasta que se logró en el ratón (Wakayama and Yanagimachi, 1999).

En Dolly se descubrió que el tamaño de los cromosomas, en la parte llamada telómero era más corta y no correspondían a la edad real de Dolly sino que a la edad de la célula donante (Ashworth *et al.*, 1998) ; esto causó gran estupor en la comunidad científica. En otras palabras sus telómeros eran los de una oveja varios años más vieja que la que correspondía a la edad de Dolly. Los telómeros se encuentran en los extremos de los cromosomas y se van acortando

cada vez que las células se dividen llegando hasta un determinado tamaño, a partir del cual las células no se dividen más. Normalmente este mecanismo protege al organismo de que se multipliquen en exceso células potencialmente peligrosas. Sin embargo investigadores de la compañía ACT con base en Massachusetts han demostrado exactamente lo contrario (Lanza *et al.*, 2000), y por clonación podría elongarse los telómeros y en términos celulares rejuvenecer las células.

Algunos de los grandes problemas del clonado, incluso descritos en los trabajos de neozelandeses y japoneses (Wells *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1999), siguen siendo las numerosas pérdidas durante la preñez como así la alta mortandad perinatal, que fuerza a cuidados intensivos de los recién nacidos. La causa aparente de este problema se debe a anomalías placentarias. Una de las hipótesis es que la expresión de los genes de los animales clonados es incorrecta y que la célula dadora del adulto fue reprogramada ineficientemente por el ovocito enucleado.

Breve descripción de la técnica utilizada en nuestros experimentos

La técnica utilizada con la que se aplicó sólo pequeñas variantes fue descrita previamente (Salamone *et al.*, 2001).

Obtención de ovocitos recipientes: Los ovarios bovinos fueron obtenidos en el matadero local, llevados al laboratorio en solución fisiológica y por aspiración folicular se extrajeron los complejos ovocito-cúmulus.

Remoción de las células del cúmulus: Luego de un período de maduración de 18-24 horas los ovocitos se desnudaron tratándolos por 3 min con 1 mg/ml de hialuronidasa y por agitación con vortex.

Posteriormente se seleccionaron los ovocitos que habían liberado su segundo corpúsculo polar y se encontraban en metafase II.

Enucleación: La enucleación fue realizada por microcirugía. Para observar el núcleo se teñó el ovocito con el colorante vital Hoechst 33342 y se observó con luz ultravioleta por un período menor a 10 segundos.

Preparación de la célula donante: Las células adultas de la granulosa fueron obtenidas de una vaca Jersey por aspiración de folículos guiada por ecografía y por vía transvaginal. Los fibroblastos fueron obtenidos de un toro Angus a partir de un explante de la oreja. Para las células fetales todas las células donantes fueron subcultivos obtenidos de la zona del ijar de un feto hembra de la raza Jersey de 75 días. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio α -MEM con 5% SFB.

Transplante Nuclear Propiamente Dicho: se introdujo el núcleo, con una micropipeta y se incorporó la célula completa, debajo de la zona pelúcida y en contacto con la oolema. Luego se realizó la fusión por un pulso eléctrico. El procedimiento de fusión consiste básicamente en la aplicación de un pulso eléctrico, lo suficiente como para causar una rotura transitoria de las membranas a fusionar. Esta rotura es de muy corta duración y es reparada rápidamente, pero si ambas membranas están en perfecta oposición se forman pequeños canales entre ambas células. Debido a la inestabilidad termodinámica estas pequeñas aberturas se hacen mayores y las dos células se transforman en una luego de un cierto período de tiempo.

Activación: Se indujo por tratamiento con ionóforo por 4 minutos seguido por 3 hs de incubación en DMAP.

Cultivo embrionario in vitro, transferencia de los embriones: se

utilizaron diversos sistemas de cultivo que luego se describirán, todos ellos fueron llevados a cabo en 500 microlitros de medio cubierto por 200 microlitros de aceite mineral en placas marca Nunc de 4 celdas. Se cultivaron por 7 días de manera tal que los embriones pudieron ser implantados en forma no quirúrgica en una vaca recipiente previamente sincronizada a la edad del embrión.

Resultados de Clonación con células adultas

Diferentes tipos de células (granulosa, fibroblastos) y de sistemas de cultivo embrionario fueron probadas en un experimento destinado a incrementar la tasa de sobrevivencia de embriones producidos por clonación a partir de células somáticas adultas. Luego del trasplante nuclear, fusión y activación tres sistemas de cultivos fueron utilizados cuando las células donantes fueron fibroblastos adultos: *TCM-199+5% FCS* y *Menez+5% FCS* (ambos con células Vero como co-cultivo y atmósfera con 5 % de CO₂ en aire) y *SOF* sin co-cultivo pero con una baja concentración de O₂ (5 % O₂, 5% de CO₂ y 90 % de N₂). También se utilizaron células de la granulosa como donantes y los embriones producidos se cultivaron con *Menez+5% FCS* y células Vero como co-cultivo y 5 % de CO₂ en aire. Los resultados se describen en la tabla 1.

El grupo tratamiento *SOF* tuvo clivaje y desarrolló hasta blastocisto en mayor proporción que los otros tratamientos, además se simplificó el trabajo de laboratorio dado que entre otras ventajas no se necesitaba preparar la línea celular para el co-cultivo por lo que se decidió su utilización en el siguiente experimento. Sin embargo el único animal que llegó a término fue producido

a partir de TC199 + VERO y pero murió durante el parto. Se observó que pesar de haber producido numerosas preñeces (ver Tabla 1) una sola prosperó hasta la fecha de parto. En coincidencia con otros autores (Wells *et al.*, 1999; Kato *et al.*,

1999) hubo numerosas pérdidas durante la preñez. Estos autores también observaron una alta mortandad perinatal y con nuestra experiencia se demostró la necesidad de incrementar los cuidados intensivos de recién nacidos.

Tabla 1. Clonación con células adultas

Tratamiento	n	Clivaje(%)	Blastocisto(%)	Preg.(%)	Nacimientos
Granulosa C199+VERO	92	59 (64)	26 (28)b	11 (12)	0
Fibroblasto TC199+VERO	294	53.9 a	22(7.5)a	5(38.4)	1
Fibroblasto Menezos+VERO	324	72.3 bc	29(8.9)a	5(29.4)	0
Fibroblasto SOF	108	75.0 bc	24(22.2)b	5(45.4)	0

Clonación utilizando células donantes fetales transgénicas

Con la finalidad de desarrollar un sistema para producir animales transgénicos se utilizaron como células donantes fibroblastos fetales, transfectados o no. Para la línea transfectada también se determinó si la roscovitina podía incrementar la disponibilidad de ovocitos recipientes a lo largo de la semana. La roscovitina es un inhibidor de MPF y MAPK dos complejos reguladores de la maduración ovocitaria. Luego de iniciada la maduración normal todos los eventos son regulados por un rápido incremento en MPF y MAPK citosólicos. Estos previenen la reconstrucción de la membrana nuclear y la entrada del núcleo en fase de síntesis de ADN hasta la fertilización o activación. La maduración nuclear se puede detener con roscovitina dado que mantiene MPF y MAPK bajos. Esto permite retrasar la maduración 24 horas. La combinación del uso o no uso de esta droga posibilita trabajar por 2 días luego de un viaje al frigorífico. Si no se

tratan los ovocitos con roscovitina un día después se tendrán numerosas metafases II para enucleación y el trasplante nuclear. Por el contrario si son tratadas con roscovitina recién podrá realizarse el trasplante nuclear 48 hs después, dado que las primeras 24 hs en roscovitina inhiben la maduración manteniendo el ovocito como vesícula germinal y luego se requiere 24 horas más para llegar a metafase II.

Los embriones producidos en todos los tratamientos fueron cultivados en SOF sin co-cultivo pero con una atmósfera de 5% de O₂, 5 % de CO₂ y 90 % de N₂. Para la transfección se utilizó una construcción con el gen neomicina, un promotor y el gen de la hormona del crecimiento humana (GH) la construcción se introdujo a las células donantes por liposomas. Luego se realizó la selección con geneticina por 10-15 días. Los resultados se describen en la tabla 2.

No se observaron diferencias entre tratamientos. La transfección no afectó la capacidad de desarrollo de los animales

clonados, tampoco afectó el tratamiento de la recipiente con roscovitina, sorprendentemente con este último tratamiento se observó una tendencia positiva en el desarrollo. Se produjeron trece animales transgénicos en menos de un año de trabajo lo que demuestra el potencial de esta técnica.

Aplicaciones científicas y comerciales de la transferencia nuclear

En la Argentina se han adoptado muchas de las llamadas “Biotecnologías de la Reproducción” con relativa rapidez, tanto por la acción de profesionales de la actividad privada como la realizada por investigadores de organismos oficiales. Prueba de esto es la realización en 1978 de las primeras transferencias quirúrgicas de embriones por el doctor Rodríguez Dubra y colaboradores, los primeros nacimientos por fertilización *in vitro* (Salamone et al. 1995), y el reciente nacimiento de terneras por clonación y transgénesis (Salamone et al. 2003). Todos estos hechos fueron producidos pocos años después de generadas estas tecnologías en los países desarrollados. Lo que nos permite ser optimistas respecto a las posibilidades futuras para el desarrollo y aplicación de estas técnicas en nuestro país.

El clonado ha tenido un desarrollo tan vertiginoso y un interés general tan grande que ha sido fácil seguir su evolución por los medios de divulgación

masiva. Sin embargo, ha prevalecido el enfoque alarmista debido a su potencial aplicación en humanos. Por el contrario es nuestra opinión que esta técnica ayudará a generar conocimientos básicos para descubrir las bases de la totipotencialidad celular y la rediferenciación de los tejidos, permitiendo su aplicación terapéutica, para regenerar tejidos lesionados, incluyendo el tejido nervioso y el pancreático entre otros.

A la pregunta ¿cuáles serán sus aplicaciones agropecuarias en nuestro sistema de producción? La respuesta es que están libradas a nuestra capacidad de imaginación e innovación. La aplicación más inmediata será la multiplicación de rodeos de elite. La utilización de animales clonados facilitará la producción y difusión de animales transgénicos. Por ejemplo, existe interés en Europa en reemplazar el gen PrP que torna a los bovinos susceptibles al virus de la vaca loca por otro que le otorgue mayor resistencia. Numerosas compañías ya han producido animales transgénicos y clonados especialmente expresando nuevas proteínas en leche de valor farmacéutico (Baguisi *et al.*, 1999, Salamone et al. 2003). La producción de órganos y tejidos animales humanizados para ser utilizados en trasplante ha despertado también un interés enorme. Esto implicará la expresión de ciertas proteínas humanas y el silenciamiento de algunas proteínas de origen animal.

Tabla 2. Clonación utilizando como células donantes fibroblasto (F.) fetales transgénicas o no y recipientes tratados con roscovina.

Tratamiento	n	Clivaje (%)	Blastocisto (%)	implantes	Preñez	Nacidos
F. no transfectado	197	122(62)	33(16.7)	16	5(31)	1
F. transfectado	646	476(74)	128(19.8)	56	25(44.6)	7
F. transfectado roscovitina	228	191(84)	51(22.3)	30	16(53.3)	6

Agradecimientos

A la empresa Biosidus por la financiación total del proyecto y facilidades para realizar los experimentos mencionados. A L Baranao y L Bussman por las transfecciones de las células donantes. A

los integrantes de Munar y asociados por la colaboración en las transferencias embrionarias. A Jorge Artuzo por el cuidado de los terneros y Dr G Berra por su ayuda durante los nacimientos.

Referencias

- Ashworth, D., Bishop, M., Campbell, K., Colman, A., Kind, A., Schnieke, A., Blott, S., Griffin, H., Haley, C., McWhir, J., and Wilmut, I. (1998). DNA microsatellite analysis of Dolly [letter] [see comments]. *Nature* **394**, 329.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D. T., Pollock, J. S., Destrempes, M. M., Cammuso, C., Williams, J. L., Nims, S. D., Porter, C. A., Midura, P., Palacios, M. J., Ayres, S. L., Denniston, R. S., Hayes, M. L., Ziomek, C. A., Meade, H. M., Godke, R. A., Gavin, W. G., Overstrom, E. W., and Echelard, Y. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* **17**, 456-61.
- Cibelli, J. B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F. A., and Robl, J. M. (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts [see comments]. *Science* **280**, 1256-8.
- Dinnyés A, P De Sousa, T King, and I Wilmut. (2002). Somatic Cell Nuclear Transfer: Recent Progress and Challenges Cloning and Stem Cells 4: 81-90.
- Kato, Y., Yabuuchi, A., Motosugi, N., Kato, J., and Tsunoda, Y. (1999). Developmental potential of mouse follicular epithelial cells and cumulus cells after nuclear transfer. *Biol Reprod* **61**, 1110-4.
- Y. Heyman, P. Chavatte-Palmer, D. LeBourhis, S. Camous, X. Vignon, and J.P. Renard
Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos
Biol Reprod 2002 66: 6-13.
- Lanza, R. P., Cibelli, J. B., Blackwell, C., Cristofalo, V. J., Francis, M. K., Baerlocher, G. M., Mak, J.,

- Schertzer, M., Chavez, E. A., Sawyer, N., Lansdorp, P. M., and West, M. D. (2000). Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* **288**, 665-9.
- Renard JP, Zhou Q, LeBohurgis D, Chavatte-Palmer, I Hue, Y Heyman and Vignon. 2002. Nuclear Transfer Technologies: Between successes and doubts *Theriogenology* **57**: 203
- Robl, J. M., Prather, R., Barnes, F., Eyestone, W., Northey, D., Gilligan, B., and First, N. L. (1987). Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci* **64**, 642-7.
2001. Ooplasmic and Nuclear Maturation of Calf Oocytes: Assessment By Biochemical And Nuclear Transfer Approach. D. F. Salamone, P. Damiani, R. A. Fissore, J. M. Robl and R. T. Duby. *Biology of Reproduction*, Junio, **64**:1761-1768
- Salamone D. F., C. B. Santos, J. L. Barañao, L. Bussmann, J. Artuso, A. Valdez, C. Munar, C. Werning and C. Melo, 2003. Effect of different culture systems, donor cell origin and roscovitin treatment of recipient oocytes in bovine cloning. *Theriogenology* **59**: 285.
1995. Salamone et al. 1995. Producción de los Primeros Terneros Nacidos en la Argentina Por Maduración Y Fertilización In Vitro de Ovocitos Recuperados de Animales Sacrificados para Consumo. Seminario Internacional de Embriones Biotecnología y Tecnologías Avanzadas. 4-5 Mayo Montevideo. Uruguay.
- Schnieke, A. E., Kind, A. J., Ritchie, W. A., Mycock, K., Scott, A. R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., and Campbell, K. H. (1997). Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts [see comments]. *Science* **278**, 2130-3.
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [see comments]. *Nature* **394**, 369-74.
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1999). Cloning of male mice from adult tail-tip cells [news]. *Nat Genet* **22**, 127-8.
- Wells, D. N., Misica, P. M., and Tervit, H. R. (1999). Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biol Reprod* **60**, 996-1005.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [see comments] [published erratum appears in *Nature* 1997 Mar 13;386(6621):200]. *Nature* **385**, 810-3.

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 INE/VH

Línea Celular	Descripción	Especie	Tipo celular	Origen
BHK-21	Rinon de hamster dorado	Hamster	Monocapa de fibroblastos	ATCC
EHD-K1	Ovario de hamster chino	Hamster chino	Monocapa epitelial	ATCC
MRC-5	Pulmon fetal humano <i>(diploide)</i>	Hombre	Monocapa de fibroblastos	ATCC
WI-38	Amnion humano	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Hep-2	Carcinoma humano <i>(tetraploide)</i>	Hombre	Monocapa epitelial	ATCC
Varo C-76	Rinon de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
Varo E-6	Rinon de mono verde africano	Mono	Monocapa de fibroblastos	ATCC
L-929	Tejido conectivo de raton	Raton	Monocapa epitelial	ATCC
MDCK	Rinon bovino	Vaca	Monocapa epitelial	ATCC
BE13	Rinon de conejo	Conejo	Monocapa epitelial	ATCC
DFK	Rinon 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 <i>Aedes albopictus</i>	Mosquito		ATCC
A-72	Tumor canino	Rato		ATCC
A-549	Carcinoma de pulmon	Hombre		ATCC
+ 3T3	Embrión de raton	Raton	Monocapa de fibroblastos	
SK-MEL-28	Melanoma maligno humano	Hombre		ATCC
CV-1	Fibroblastos de rinon	Mono		ATCC

Líneas disponibles en INTA:

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