

ARTÍCULO ORIGINAL

Características de nuevos cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Ariosto Ardila, Jesús Escovar, Felio Bello

Laboratorio de Investigaciones en Entomología, Biología Celular y Genética, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Bogotá, D. C., Colombia

Introducción. Los cultivos celulares de insectos son una metodología útil en estudios biomédicos y tecnológicos.

Objetivo. El propósito principal del presente trabajo fue obtener y caracterizar cultivos celulares derivados de tejidos embrionarios de *Aedes aegypti*.

Materiales y métodos. Se emplearon huevos embrionados para los explantes de tejidos en los medios de cultivos MM/VP12 y L-15/Grace, con suplemento de 20% de suero fetal bovino y una mezcla al 1% de antibiótico y antimicótico, con un rango de pH entre 6,8 y 7,0. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28°C sin atmósfera de CO₂.

Resultados. El crecimiento celular se obtuvo en el medio L-15/Grace, 3 semanas después de haber sido sembrados los tejidos embrionarios; sin embargo, se necesitaron 6 meses para la formación de la monocapa confluyente. Desde agosto de 2003 hasta junio de 2004, se habían realizado 28 subcultivos. Las células se caracterizaron morfológicamente; predominaron las formas epitelioides en subcultivos de pases altos. También se reconocieron las particularidades morfométricas del cariotipo y, además, se determinaron los perfiles isoenzimáticos y moleculares de los cultivos celulares, los cuales se compararon con muestras de adultos de la especie tomadas de la misma colonia y con líneas celulares derivadas de otros insectos.

Discusión y conclusiones. Estas células representan, potencialmente, un importante sistema *in vitro* en investigaciones básicas y aplicadas.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, cultivos celulares, vesículas, cariotipos, isoenzimas, RAPD-PCR.

Characteristics of new cell cultures derived from embryonic tissues of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

Introduction. Cell cultures from insects are a useful methodology in technological and biomedical studies.

Objective. The present work was aimed at obtaining and characterizing cell cultures derived from *Aedes aegypti* embryonic tissues.

Materials and methods. Embryonated eggs were used for embryonic tissue explants in L-15/Grace and MM/VP12 culture media, supplemented with 20% fetal bovine serum and a mixture of 1% antimycotic and antibiotics, at a pH ranging from 6.8 to 7.0. The incubation temperature was 28°C; a CO₂ atmosphere was not required.

Results. Cell growth was obtained in L-15/Grace medium three weeks after embryonic tissues explants. Six months were required for achieving a confluent monolayer. Twenty-eight serial cell subcultures were carried out from August 2003 to June 2004. Cell morphology was characterized as epithelial in the later subcultures. Karyotype morphometry as well as molecular and isozymatic profiles were established. The cultures were compared with adult samples from the species taken from the same colony and with cell lines derived from other insects.

Discussion and conclusions. These cells are an important *in vitro* system in applied and basic research.

Keywords: *Aedes aegypti*, cell cultures, vesicles, karyotypes, isozymes, RAPD-PCR.

Aedes aegypti es un mosquito doméstico, principal vector de la fiebre amarilla urbana, del dengue clásico y hemorrágico, de otros arbovirus y de la filariasis linfática humana (1).

En Colombia, los primeros brotes de dengue - asociados con los serotipos 2 y 3- se presentaron en la década de los setenta y, desde 1984 hasta nuestros días, han estado circulando en el país los cuatro serotipos, originando periódicamente brotes de la enfermedad, todos los cuales han sido transmitidos por *Ae. aegypti* (2,3) (datos de la vigilancia en salud pública del dengue, Laboratorio de Virología, Centro Control de Enfermedades, Instituto Nacional de Salud).

Aunque los brotes de fiebre amarilla que se han presentado en Colombia son principalmente selváticos, y el mayor número de casos -superiores a 100- se registraron en el 2003 y el 2004 (4,5), existe el riesgo latente de la urbanización de la enfermedad debido a la presencia de *Ae. aegypti* en la cercanía de algunas áreas enzoóticas (4).

Este mosquito está distribuido alrededor del mundo en las áreas tropicales y subtropicales, entre los 35° de latitud norte y los 35° de latitud sur (3). En Colombia, la distribución es amplia y se extiende desde la Costa Atlántica hasta la frontera con Ecuador y desde la Costa Pacífica hasta los Llanos Orientales. Se le encuentra desde el nivel del mar hasta los 2.200 m de altura y en centros urbanos así como en casas rurales y aisladas (6-8).

La primera línea celular de mosquitos fue establecida por Grace en 1966 (9), a partir de larvas próximas a la pupación de *Ae. aegypti*; posteriormente, se establecieron otras líneas celulares de esta misma especie obtenidas, en orden cronológico, por Singh en 1967 (10), Peleg en 1968 (11,12) y Varma y Pudney en 1969 (13). Se han reportado, aproximadamente, 50 líneas

celulares de la familia Culicidae, que corresponden a 22 especies diferentes y, de éstas, 3 han sido establecidas a partir de tejidos embrionarios de mosquitos colonizados en Colombia: *Aedes taeniorhynchus*, *Anopheles albimanus* y *Psorophora confinnis* (14-17).

Los cultivos celulares de insectos se utilizan, comúnmente, como sustratos para el aislamiento e identificación de arbovirus (18); sin embargo, existe en la actualidad una amplia gama de aplicaciones de esta técnica en investigaciones biomédicas y tecnológicas (19), entre las cuales sobresalen: la expresión de genes exógenos a partir de moléculas de ADN recombinante para el análisis de procesos genéticos de regulación, los cuales son difíciles de medir en el organismo entero (20); los estudios de cocultivos con parásitos (21); los estudios de entomopatógenos, reguladores del crecimiento o de compuestos bioquímicos usados contra insectos (22); la detección y dosis de entomopatógenos o sus toxinas de muestras ambientales (23); la respuesta hormonal *in vitro* (24); la fisiología celular (25), y el aislamiento y la caracterización de bioinsecticidas (26).

En el presente trabajo se describen las características de crecimiento, morfológicas, citogenéticas, de perfiles isoenzimáticos y moleculares de nuevos cultivos celulares, obtenidos de tejidos embrionarios del mosquito *Ae. aegypti*.

Materiales y métodos

Material entomológico. Los huevos embrionados del mosquito *Ae. aegypti* se tomaron de una colonia establecida en el Laboratorio de Entomología de la Universidad de La Salle, la cual se inició con adultos recolectados en Riohacha (La Guajira, Colombia), en julio de 2002, y se ha mantenido durante 2 años, aproximadamente, a una temperatura promedio de 27°C con una humedad relativa del 80% y 12 horas de fotoperiodicidad, y con un total de 25 generaciones sucesivas.

Cultivos celulares primarios. Para cada uno de los explantes se utilizaron de 650 a 700 huevos de 3 a 4 días de incubación, en estado avanzado de embriogénesis. Las posturas se realizaron en

Correspondencia:

Felio J. Bello, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de La Salle, Carrera 2 No. 10-70, Torre A, piso 5, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono: (571) 353 5360, extensión 2504; fax: (571) 286 8391.

fbello@urosario.edu.co

Recibido: 23/06/04; aceptado: 20/01/05

recipientes con agua limpia de donde se tomaron directamente para el desarrollo del procedimiento de esterilización. Los huevos se retiraron de la superficie del agua por adherencia a un papel de filtro y, luego, se desprendieron mediante el arrastre con agua, cuya presión fue ejercida por la propulsión del líquido contenido en un frasco lavador y, simultáneamente, se recibieron en un tubo de centrifuga de 50 ml. Previa centrifugación a 1000g durante 5 minutos, se retiró el agua y se adicionó a los huevos una solución de hipoclorito de sodio al 1,6%, la cual se dejó actuando sobre su superficie con agitación continua durante 15 minutos; al final, se repitió la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se vertió una solución de etanol al 70% sobre el precipitado, se resuspendieron los huevos y se volvió a repetir el procedimiento anterior. Finalmente, los huevos se lavaron tres veces con agua destilada estéril (27). Después de la esterilización, los huevos embrionados se enjuagaron con el medio de crecimiento seleccionado. Se llevó 1 ml de la masa de huevos a un homogenizador, donde se rompieron mecánicamente. La solución resultante se sembró en un frasco plástico para cultivos de tejidos de 25 cm² de superficie, que contenía 10 ml del medio de crecimiento; en algunas ocasiones se utilizó MM/VP12 (28) y en otros explantes, una mezcla de partes iguales del medio L-15 (29) y del medio Grace (30), con suplemento de suero fetal bovino (SFB) al 20% y una solución de antibiótico y antimicótico al 1%; el pH de los medios se ajustó en el rango de 6,8 a 7,0. Los frascos de cultivos se llevaron a incubación a 28°C sin atmósfera de CO₂, y se observaron diariamente mediante la ayuda de un microscopio invertido Olympus CK-2.

Subcultivos. El primer subcultivo exitoso se realizó en agosto de 2003 y, hasta la fecha (junio de 2004), se han efectuado 28. La remoción de las monocapas confluentes se hizo mecánicamente con un policia de goma; no obstante, también se ensayó con tripsina al 1%. Después de resuspendidas las células, se procedió a la dispersión de éstas mediante pipeteo vigoroso y, a continuación, la solución celular se trasladó a un frasco que previamente contenía 5 ml de medio fresco. Los primeros 5 subcultivos

se desarrollaron en una proporción de 1:1, con un promedio de duración de 30 días. A partir del subcultivo 6 hasta el 12 se hicieron en una relación de 1:2 con intervalos de 15 días. De aquí en adelante, los subcultivos se realizaron gradualmente hasta llegar a proporciones de 1:3 cada 10 días.

Características morfológicas. En el proceso de crecimiento de los cultivos primarios y subcultivos, las formas celulares se determinaron mediante observación diaria, usando un microscopio invertido Olympus con contraste de fase y sistema microfotográfico, en aumentos de 100 a 400; las mejores imágenes se fotografiaron. Se procesaron células en monocapa semiconfluente de un cultivo primario avanzado mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión, según el procedimiento descrito por Cali *et al.* (31).

Preparación de cromosomas. Se emplearon muestras de cultivos primarios y subcultivos para la obtención de cromosomas metafásicos. Se agregó a los cultivos una concentración de 0,016% de colchicina en un periodo de 3 horas; las células se removieron y la solución resultante se centrifugó a 1.000g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se le adicionó solución de KCl al 0,56%, se agitó con una pipeta de Pasteur y se dejó actuando por 30 minutos; al cabo de este tiempo, se volvió a centrifugar y, siguiendo el procedimiento anterior, se agregó solución de Carnoy (metanol y ácido acético 3:1) durante 15 minutos. Se hicieron 3 lavados seguidos con la misma sustancia; finalmente, en un volumen de 1 ml de Carnoy se goteó la suspensión celular sobre láminas limpias y desengrasadas. La coloración se efectuó con Giemsa al 2% (32,33). Se fotografiaron las mejores metafases. Se seleccionaron 20 cariotipos y en cada uno de ellos se efectuaron las siguientes mediciones: brazo corto (p), brazo largo (q), relación de brazos (p/q) (q/p), longitud total (LT) y longitud relativa (LR); este dato se obtuvo dividiendo el valor de la longitud de cada cromosoma por la longitud total del genoma; el índice centromérico (IC) se encontró midiendo la relación del brazo corto de cada cromosoma sobre la longitud total del mismo y, finalmente, la longitud relativa promedio de los cromosomas (LRPC) se registró

al relacionar la longitud total de cada cromosoma con la longitud del cromosoma más pequeño del genoma (34,35).

Perfiles isoenzimáticos. Se examinaron los fenotipos de cuatro sistemas isoenzimáticos diferentes: fosfoglucoasa isomerasa (PGI-5.3.1.9), fosfoglucomutasa (PGM-2.7.5.1), isocitrato deshidrogenasa (ICDH-1.1.1.42) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGDH-1.1.1.4.4). Las isoenzimas se separaron mediante la técnica en acetato de celulosa, de acuerdo con el procedimiento descrito por Brown y Knudson (36). Las muestras celulares se corrieron simultáneamente con extractos de adultos de la misma especie, tomados de la cepa Riohacha, y con dos líneas celulares, Lulo (37) y PC-0199-BR (16).

RAPD-PCR. Para la extracción del ADN genómico se tomaron células en monocapas confluentes. Después de la remoción mecánica de las células se centrifugó el contenido para retirar el medio de cultivo y, luego, se procedió a efectuar tres lavados consecutivos del sedimento celular con PBS; con el propósito de eliminar los residuos del medio de cultivo sobre la superficie de las células, el precipitado se ajustó a una concentración de 2×10^6 células/ml. Se utilizó, a continuación, el método modificado de Landry *et al.* (38), el cual consistió en adicionar, manteniendo las muestras sobre hielo, al precipitado celular 480 μ l de una solución tampón de lisis (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 70 mM de EDTA, 2 mM de NaCl, 20 mM de metabisulfito de sodio). El tubo Eppendorf con el contenido se agitó varias veces y, luego, se agregaron 120 μ l de solución acuosa de sarcosil de sodio. Luego, se llevó a incubación en un baño de agua a 55°C durante 2 horas y, posteriormente, se centrifugó a 14.000g a temperatura ambiente durante 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf y, a continuación, se agregaron 270 μ l de acetato de amonio 10 M y 600 μ l de isopropanol. Previa agitación del tubo, se llevó a -80°C por 20 minutos. Entonces, la muestra se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó. El sobrenadante se removió y se enjuagó el sedimento con 1.000 μ l de etanol al 70%; luego de retirar la solución anterior, previa centrifugación, el tubo se colocó en posición invertida sobre un papel de filtro hasta que se

secara completamente el precipitado. Éste, finalmente, fue disuelto en 50 μ l de solución tamponada TE (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM Na_2 EDTA) y se almacenó a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Para la extracción del ADN de especímenes adultos de *Ae. aegypti*, se utilizó el protocolo de Coen *et al.* (39).

La técnica de la PCR se estandarizó teniendo en cuenta las sustancias variables en la mezcla de reacción que pudieron incidir más directamente en el proceso de amplificación. La mezcla de reacción tuvo la siguiente composición: 2,5 μ l de tampón A (10X), 1 μ l mezcla de dNTP (10 mM), 1,25 μ l de MgCl_2 (50 mM), 1 μ l del iniciador (10 μ M), 0,2 μ l de Taq ADN polimerasa (1 U/ μ l), 5 μ l de ADN (10 ng/ μ l) y 14,05 μ l de H_2O ultrapura, para un volumen final, por muestra, de 25 μ l. Los cuatro iniciadores (A2=5'-TGCCGAGCTG-3'; A10=5'-ACGGCGTATG-3'; A20=5'-GTTGCGATCC-3'; y E07=5'-AGATGCAGCC-3'), sintetizados por Invitrogen™, se seleccionaron teniendo en cuenta su nivel de polimorfismo en los estudios previos sobre identificación y diferenciación de subespecies de *Ae. aegypti* (40), y también en análisis de variabilidad genética en poblaciones de este insecto (41) y de otras especies de mosquitos (42,43). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler; el programa utilizado en la corrida fue: 1 preciclo a 95°C de 5 minutos, seguido de 45 ciclos, cada uno de ellos desarrollados durante 1 minuto a 94, 55 y 72°C; la extensión final fue a 72°C por 5 minutos.

Los productos amplificados a partir de muestras de ADN de células de *Ae. aegypti*, adultos de la misma especie y de las células Lulo se corrieron en un sistema electroforético sobre agarosa al 1,5%, durante 90 minutos a 150 V; las bandas, teñidas con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml), se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultravioleta. Para los análisis se tuvieron en cuenta tanto la presencia de bandas como su ausencia.

Resultados

Cultivos celulares primarios. El crecimiento celular se inició a las 3 semanas, después de que los tejidos embrionarios se sembraron en los

frascos de cultivo, en el medio L-15/Grace. No se presentó crecimiento en el medio MM/VP12. Aunque no hubo uniformidad en el crecimiento y proliferación celular de los cultivos primarios, en aquéllos con mayor avance en el crecimiento se observó la presencia de partículas, relativamente de gran tamaño, en el citoplasma de las células, que hicieron sospechar la presencia de microsporidios de transmisión transovárica, motivo por el cual se le adicionó albendazol al medio de cultivo, a una concentración de 5,2 µg/ml, complementado con el cambio periódico del medio, inicialmente cada 2 días y, luego, semanalmente. Con la técnica de microscopía electrónica de transmisión se descartó contaminación de las células y después de los 2 primeros subcultivos, las partículas no se volvieron a observar.

Una característica constante en todos los frascos donde hubo crecimiento celular fue la presencia de vesículas con sus paredes cubiertas de células de apariencia epitelioide, las cuales, al transcurrir el tiempo, aumentaron en número y tamaño, principalmente en aquellos cultivos con gran proliferación celular, observándose adheridas a fragmentos de tejidos, suspendidas en el medio de cultivo o asociadas, formando grandes acúmulos flotantes de estas estructuras (figura 1). Como una forma de incrementar la división y el crecimiento celular, el medio de cultivo con las vesículas se llevó a otro frasco y, con la ayuda de

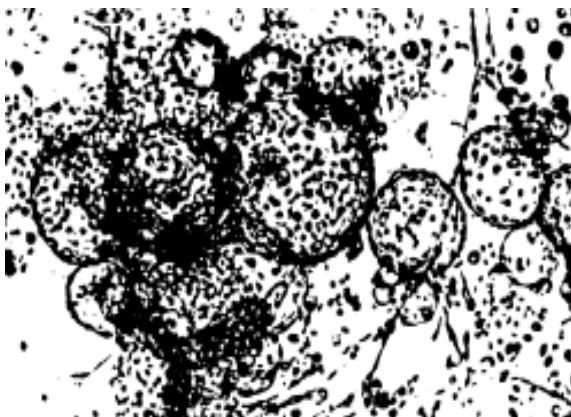


Figura 1. Aglomeración de vesículas en un cultivo primario. La superficie de proliferación celular muestra diferentes colonias en activo crecimiento; 400X.

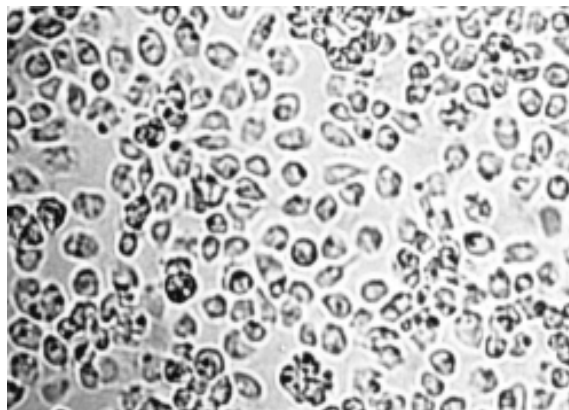


Figura 2. Monocapa semiconfluyente de un cultivo celular de *Aedes aegypti*, pase 22. La morfología celular es epitelioide; 400X.

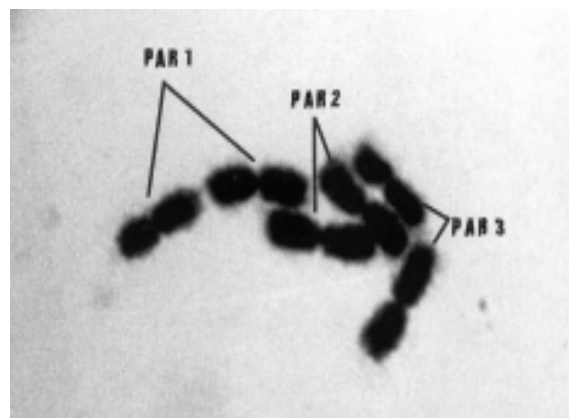


Figura 3. Complemento cromosómico diploide de *Aedes aegypti*, obtenido a partir de una célula en subcultivo 2; Giemsa, 1000X.

una pipeta, el contenido fue agitado vigorosamente varias veces hasta lograr romper y dispersar las vesículas; luego, una parte de la suspensión resultante se sembró en los cultivos de origen y la otra se llevó a un nuevo frasco, al cual previamente se le habían adicionado 5 ml de medio fresco de crecimiento. La monocapa confluyente se formó 6 meses después de haberse iniciado el proceso para la obtención de cultivos primarios.

Subcultivos. Los cinco primeros subcultivos tuvieron, en relación a su crecimiento y evolución, un comportamiento atípico, ya que mostraron un desarrollo supremamente lento y con apariencia de cultivo primario, lo que evidenció que las células tenían poca adaptación, con un estancamiento en la división después de efectuada la remoción de

la monocapa y el traslado correspondiente a otro frasco de cultivo. Sin embargo, las células mantuvieron la continuidad en los subcultivos cuando se desprendieron mecánicamente con un policia de goma y, por el contrario, no fueron viables cuando se removieron con solución de tripsina al 1%. El promedio de duración entre uno y otro subcultivo fue de 30 días, teniendo como medio de crecimiento una mezcla de partes iguales de medio Grace L-15. La división celular aumentó gradualmente a partir del subcultivo 6 hasta el 12, y el tiempo para alcanzar la confluencia de la monocapa se redujo en 15 días; no obstante, para asegurar el éxito de los subcultivos, las divisiones se desarrollaron en proporción 1:2. Hasta junio de 2004, se habían efectuado 28 subcultivos y las proporciones de la división se habían incrementando paulatinamente; actualmente, se están desarrollando en una relación de 1:3, con un tiempo promedio de duración de 10 días para alcanzar la monocapa confluyente. La concentración de SFB se redujo a medida que hubo incremento en la división celular, y en los subcultivos de pases altos a los medios se les adicionó 10% de esta sustancia.

Características morfológicas. La morfología celular fue heterogénea en los cultivos primarios; se registraron formas esféricas pequeñas, gigantes irregulares y alargadas discontinuas; sin embargo, en los subcultivos de pases altos, las formas predominantes fueron epitelioides (figura 2).

Cariotipo. La mayoría de las metafases exhibieron un número diploide de 6 cromosomas ($2N=6$), y el par 1 fue de menor tamaño y metacéntrico, el par 2 de mayor tamaño y metacéntrico y el par 3 de tamaño intermedio y ligeramente submetacéntrico (figura 3). El número fundamental fue de 12. Se observaron triploidías y tetraploidías en el 16%; las aneuploidías se

registraron en el 19%, y las más representativas fueron las monosomías y las trisomías. En el cuadro 1 se muestran las mediciones de los pares cromosómicos.

Patrones isoenzimáticos. Los fenotipos isoenzimáticos de los cultivos celulares de *Ae. aegypti*, correspondientes a PGI, 6-PGDH e ICDH coincidieron con las muestras de adultos de la misma especie y colonia; en los dos primeros se registró 1 banda para cada sistema, mientras que para ICDH hubo 2 bandas. Con el sistema PGM, los cultivos celulares mostraron dos bandas, mientras que las muestras de adultos sólo presentaron una, la cual coincidió con la migración de la banda inferior, la más cercana al origen donde se sembraron las muestras de los cultivos celulares. Al comparar los fenotipos isoenzimáticos de las anteriores muestras con la línea celular Lulo, se determinaron claras diferencias (figura 4).

Caracterización molecular. De los cuatro iniciadores evaluados, tres mostraron patrones de banda idénticos entre los cultivos celulares de *Ae. aegypti* y sus correspondientes muestras de adultos; éstos fueron: A10, A20 y E07. Hubo diferencias con el iniciador A2 (figura 5), con el cual se obtuvieron seis fragmentos de ADN para los cultivos celulares con tamaños de 855, 749, 579, 383, 342 y 277 pb, mientras que en las muestras de adultos se registraron estos mismos seis fragmentos y dos adicionales de 414 y 309 pb. Con el iniciador A10, el número de fragmentos amplificados fue de ocho y estuvieron en el rango de 298 a 2.072 pb. Con el iniciador A20 se obtuvieron nueve fragmentos y el tamaño de amplificación varió entre 309 y 1.737 pb. Finalmente, el iniciador E07 también amplificó nueve fragmentos, los cuales estuvieron en el rango de 297 a 1.737 pb. La línea celular Lulo presentó, con cada uno de los cuatro iniciadores

Cuadro 1. Promedio de las mediciones para cada uno de los pares cromosómicos del cariotipo de *Aedes aegypti*.

	p*	q*	LT*	LR	p/q	q/p	IC	LRPC	Met
Par 1	0,5±0,003	0,5±0,006	1,2±0,002	0,27	1	1	0,41	1	20
Par 2	0,8±0,005	0,8±0,007	1,8±0,003	0,40	1	1	0,44	1,5	20
Par 3	0,6±0,005	0,7±0,004	1,4±0,004	0,31	0,85	1,16	0,42	1,16	20

p: brazo corto, q: brazo largo, lt: longitud total, lr: longitud relativa, ic: índice centromérico, lrpc: longitud promedio de los cromosomas, met: metafases. *promedio más desviación estándar.

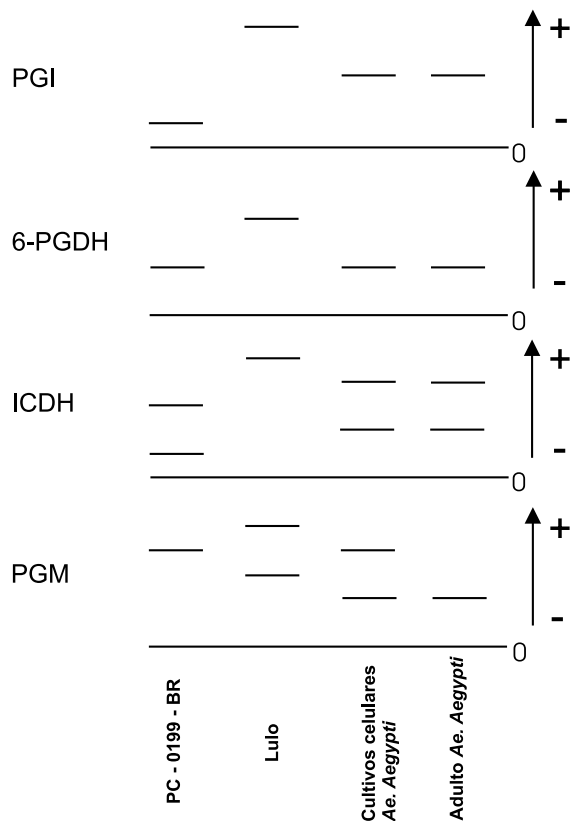


Figura 4. Representación diagramática y comparación de los perfiles isoenzimáticos, desarrollados con base en cuatro sistemas diferentes, correspondientes a muestras de los cultivos celulares y adultos de *Aedes aegypti* y, también, a muestras de las líneas celulares Lulo y PC-0199-BR.

usados, un patrón de bandas característico, diferente a los obtenidos con las muestras de cultivos celulares y de adultos del mosquito *Ae. aegypti*. Con el iniciador A2 se obtuvieron diez fragmentos de ADN, los cuales estuvieron en el rango de 269 a 1.131 pb; con el A10 hubo seis fragmentos de amplificación con valores entre 303 y 1.779 pb; con los iniciadores A20 y E07, se obtuvieron nueve y siete fragmentos de ADN, respectivamente, cuyos rangos estuvieron entre 408 y 1.825 pb para el primer iniciador y entre 297 y 760 pb para E07.

Para cada uno de los iniciadores utilizados, el procedimiento de amplificación de todas las muestras y las correspondientes corridas de electroforesis en agarosa, se repitieron tres veces, y se originaron los mismos resultados señalados anteriormente.

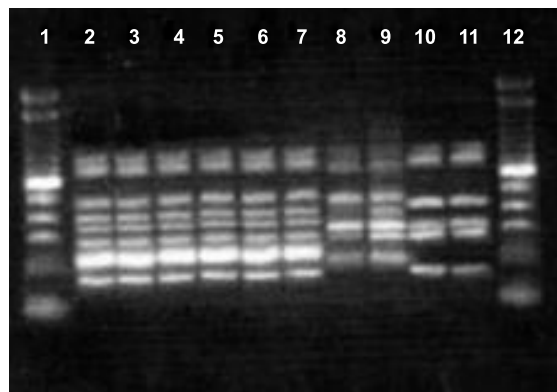


Figura 5. Patrones de amplificación, obtenidos mediante la técnica RAPD-PCR. Se muestran los perfiles moleculares obtenidos con el iniciador A2; las líneas del 2 al 7 corresponden a adultos de *Aedes aegypti*, 8 y 9 son de Lulo, 10 y 11 son de cultivos celulares de la especie y los carriles 1 y 12 pertenecen al marcador molecular (pb).

Discusión

Uno de los factores críticos importantes para el éxito en la iniciación de cultivos celulares de mosquitos a partir de tejidos embrionarios es el tiempo de incubación de los huevos, el cual se debe seleccionar en el momento en que el desarrollo del embrión, por lo menos, alcance las dos terceras partes (23), y es necesario definir para cada especie de mosquito y, de acuerdo con los parámetros ambientales y nutricionales en que se mantiene la colonia en el insectario, el rango óptimo, expresado en días, para tomar los huevos embrionados y proceder a efectuar el procedimiento de maceración y siembra en el medio de cultivo. Con los huevos de *Ae. aegypti*, cepa Riohacha, La Guajira-Colombia, utilizados en el presente trabajo para la obtención de cultivos primarios, el tiempo óptimo de incubación fue de 3 a 4 días; sin embargo, en los días anteriores o posteriores a este rango, hubo dificultades para lograr la adaptación y el crecimiento celular.

Otros factores tenidos en cuenta en la obtención de cultivos celulares primarios, no menos importantes que el anterior, para lograr crecimiento celular a partir de los tejidos embrionarios, fueron el número de huevos utilizados en cada explante y las condiciones físico-químicas adecuadas de los medios de cultivos, donde éstos -después de macerados- se sembraron. En los primeros dos meses de experimentos, el número de huevos

empleados fue de 450, aproximadamente, en cada explante, debido a la poca eficiencia que registraba la colonia en ese período; se observó dispersión de los tejidos en la superficie del frasco en la evolución de los cultivos primarios y limitadas posibilidades de las colonias celulares en su crecimiento para alcanzar la confluencia de la monocapa; sin embargo, al aumentar la densidad de la población del mosquito, en condiciones de laboratorio, las posturas se incrementaron y fue posible tomar 650 a 700 huevos, en promedio, para cada explante de tejidos, lo cual está en concordancia con las cantidades utilizadas en trabajos previos (17,44).

Aunque el crecimiento celular se inició a las tres semanas después de la siembra de los tejidos embrionarios en el medio L-15/Grace, la primera monocapa confluyente en los cultivos primarios sólo se obtuvo a los 6 meses. Si bien, esta característica de crecimiento lento de las células, en la etapa de iniciación de los cultivos, ha sido común al utilizar otras especies de mosquitos (14,16,17,45,46), probablemente, también contribuyó a la interferencia del crecimiento celular la adición de albendazol al medio de cultivo, usado durante un tiempo prolongado. Esta droga fue empleada porque previamente había demostrado actividad contra microsporidios, tanto en ensayos *in vitro* de infecciones inducidas (47-49), como en infecciones naturales de embriones utilizados en explantes para obtener cultivos celulares (16). Sin embargo, después de descartar contaminación de los cultivos con parásitos, el fármaco disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) fue suspendido. Se asumió que estas partículas correspondieron a subproductos metabólicos, secretados por las células en respuesta, probablemente, a deficiencias nutritivas; varios meses después de que las células se adaptaron y pudieron asimilar todos los requerimientos aportados por el medio, no se volvieron a formar.

La formación de vesículas y la posterior disgregación de éstas permitieron un suministro de células en activo crecimiento, las cuales se fijaron en la superficie del frasco y ocuparon espacios considerables, contribuyendo a la formación de la monocapa. La forma de proliferación y crecimiento celular, a partir de vesículas, también ha sido registrada en otros

trabajos de cultivos celulares de mosquitos (10,17,50).

Los cultivos celulares, en el presente trabajo, tuvieron una lenta evolución, los cuales, aunque se han mantenido a través de 28 subcultivos y se han congelado algunos de ellos, no permiten señalar con certeza que estamos en presencia de una línea celular establecida. Es posible que en los próximos subcultivos se acelere el crecimiento o, por el contrario, como se ha registrado en otros cultivos celulares de mosquitos (15), se presente una fase crítica, en la cual haya un gran porcentaje de muerte celular y, luego, las que sobrevivan, por selección y transformación genética a través de varias generaciones de subcultivos, entren a la etapa de crecimiento continuo para, finalmente, establecer la línea.

En los cultivos primarios, las formas de las células fueron variadas, lo cual se explica por los diversos tipos de tejidos disponibles a partir de los huevos embrionados utilizados en los explantes, quedando configurados de esta manera cultivos mixtos. En forma similar, en trabajos previos, se ha registrado la heterogénea morfología celular en la iniciación de cultivos *in vitro* en esta misma especie (8-10), al igual que en otros mosquitos (14,17,22,23,45). Sin embargo, en los cultivos celulares de insectos, después de muchos subcultivos en serie existe la tendencia al predominio de una determinada forma celular, la cual se mantiene indefinidamente en la línea. En el presente trabajo, las formas dominantes fueron epitelioides y fueron diferentes a las establecidas en las líneas celulares Mos. 20 y 29, derivadas de tejidos larvarios de *Ae. aegypti*, en las cuales la morfología celular mayoritaria en ambas fue fibroblastoide (13).

El cariotipo obtenido a partir de cultivos primarios y subcultivos celulares de *Ae. aegypti*, presentó en el 65% un número diploide de 6 ($2n=6$), en los cuales el par 1 fue el sexual, de menor tamaño y metacéntrico, el par 2 de mayor tamaño y metacéntrico, en tanto que el par 3 fue de tamaño intermedio y ligeramente submetacéntrico, lo cual está de acuerdo con la nomenclatura del cariotipo de la especie, establecida por Rai (51) y McDonald y Rai (52). También se registraron poliploidías (16%) y aneuploidías (19%). Las primeras fueron

identificadas como triploidías y tetraploidías, en tanto que las aneuploidías correspondieron a monosomías y trisomías. Los anteriores porcentajes de anomalías cromosómicas fueron altos, si se tiene en cuenta que se obtuvieron de cultivos primarios y de subcultivos en la serie baja, en la cual no hubo evidencia de un acelerado crecimiento celular; es probable que esta situación se haya presentado como consecuencia de la adición de DMSO a los cultivos, el cual se caracteriza como un agente alquilante y mutágeno (53).

Los resultados de los patrones electroforéticos con base en cuatro sistemas mostraron coincidencias entre los cultivos celulares y las formas adultas de *Ae. aegypti*, pertenecientes a la colonia, en los sistemas PGI, 6-PGDH e ICDH y, contrariamente, fueron diferentes en PGM. Lo anterior se explica porque en los tres primeros sistemas los cultivos celulares continuaron siendo representativos de la especie y no sufrieron ninguna variación genética con respecto a los tejidos originarios, en tanto que para PGM, las muestras de adultos presentaron cambios en este marcador, y mostraron la forma homocigota, probablemente, debido a las fuertes presiones selectivas ocurridas durante el proceso de la colonización, con pérdida y fijación de alelos (54); mientras los cultivos celulares retuvieron la heterocigocidad inicial, que se supone tenían las muestras de huevos embrionados, tomados 14 meses antes del uso de los adultos de la misma cepa en la técnica de electroforesis. Por otra parte, la comparación entre los cultivos celulares y las líneas celulares Lulo y PC-0199, con base en los cuatro sistemas isoenzimáticos, produjo resultados diferentes y característicos para cada una de ellos, lo cual permitió descartar contaminación cruzada de los cultivos celulares analizados.

La caracterización molecular, desarrollada con la técnica RAPD-PCR, generó perfiles de ADN idénticos entre los cultivos celulares y muestras de adultos de *Ae. aegypti* en la amplificación de tres iniciadores (A10, A20 y E07) y sólo en A2 hubo diferencias en el número de fragmentos obtenidos; sin embargo, coincidieron en el tamaño de éstos donde fueron comunes. De acuerdo con

Léry *et al.* (55), los cultivos celulares de insectos no están sujetos a pérdida en la evolución de los cultivos primarios de material genético y reflejan la diversidad alélica de las poblaciones naturales de la cual se derivan; por esta razón, la técnica empleada es útil para distinguir líneas celulares obtenidas de especies filogenéticamente relacionadas y aun entre líneas celulares de la misma especie. La comparación de los perfiles de RAPD entre los cultivos celulares del presente trabajo con la línea Lulo mostró diferencias en el número de fragmentos amplificados como también en el tamaño de los mismos, lo que corrobora de esta forma la diversidad genética existente entre ellas.

Los cultivos celulares derivados de *Ae. aegypti* descritos en el presente trabajo representan un sistema *in vitro* importante, potencialmente útil en aplicaciones biomédicas, los cuales se utilizarán, en una primera fase, en ensayos de susceptibilidad a infecciones con arbovirus, principalmente dengue y fiebre amarilla, también en cocultivos con parásitos para el mantenimiento o desarrollo del ciclo biológico de patógenos.

Agradecimientos

A Gilberto Torres, auxiliar del Laboratorio de Entomología de la Universidad de La Salle, por el suministro del material entomológico utilizado en esta investigación. A Gloria Patricia Barrera, directora del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Corpoica-Ceisa, por el apoyo brindado en el procesamiento de las muestras con la técnica de microscopía electrónica de transmisión. A Jairo Tovar, investigador del Laboratorio de Biología Celular y Neurociencias de la Pontificia Universidad Javeriana, por la colaboración en el desarrollo de la tesis de maestría del primer autor, cuyos resultados se presentan en este artículo.

Conflicto de intereses

En la realización del trabajo no se presentó ningún conflicto de interés financiero, político ni académico.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por la Universidad de La Salle (PIN-07-2002).

Referencias

1. **Tabachnick WJ.** The yellow fever mosquito. Evolutionary genetics and arthropod-borne disease. *Am Entomol* 1991; 37:14-29.
2. **Boshell J, Groot H, Gacharná MG, Márquez G, González M, Gaitán MO et al.** Dengue en Colombia. *Biomédica* 1986;6:101-6.
3. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guía para su prevención y control. Publicación científica 548. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud; 1997.
4. **Rodríguez G, Velandia M, Boshell J.** Fiebre amarilla. La enfermedad y su control. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2003.
5. **Velandia MP.** La fiebre amarilla y su control. *Biomédica* 2004;24:5-6.
6. **Suárez MF, Nelson MJ.** Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica* 1981;1:225.
7. **Morales A.** *Aedes aegypti* en zona rural del municipio de La Mesa (Cundinamarca), Colombia, S.A. *Biomédica* 1981;1:223-4.
8. **Nelson JM, Suárez MF, Morales A, Archila L, Galvis E.** *Aedes aegypti* in rural areas of Colombia. Geneva: WHO/VBC; 1984.
9. **Grace TDC.** Establishment of a line of mosquito (*Aedes aegypti* L) cells grow in vitro. *Nature (London)* 1966; 211:366-7.
10. **Singh KRP.** Cell culture derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L). *Curr Sci* 1967; 36:506-8.
11. **Peleg J.** Growth of arboviruses in monolayers subcultured mosquito embryos cells. *Virology* 1968;35: 617-9.
12. **Peleg J.** Inapparent persistent virus infection in continuously grown *Aedes aegypti* mosquito cells. *J Gen Virol* 1969;5:463-71.
13. **Varma MGR, Pudney M.** The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* (L) larvae in different media. *J Med Entomol* 1969;6:432-9.
14. **Bello FJ, Boshell J, Rey G, Morales A, Olano V.** Initiation of primary cell cultures from embryos of the mosquitoes *Anopheles albimanus* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1995;90:547-51.
15. **Bello FJ, Rodríguez J, Boshell J, Olano V, Morales A, Rey G et al.** Características de una línea celular de crecimiento continuo de *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *Biomédica* 1996;16:32-40.
16. **Bello FJ, Brochero H, Boshell J, Olano V, Rey G.** Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:123-8.
17. **Bello FJ, Rodríguez J, Escovar J, Olano V, Morales A, González M et al.** A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infections with arboviruses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:865-73.
18. **Igarashi AI.** Mosquito cell culture and study of arthropod-borne togaviruses. *Adv Virus Res* 1985;30:21-42.
19. **Braude-Zolotarjova TY, Kakpakov VT, Schuppe NG.** Male diploid embryonic cell line of *Drosophila virilis*. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986;22:481-4.
20. **Helgen JC, Fallon AM.** Polybrene-mediated transfection of cultured lepidopteran cells: induction of a *Drosophila* heat shock promoter. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:731-6.
21. **Leake CJ.** Establishing primary cell culture from disease vectors and maintenance of continuous cell line. En: Crampton JM, Beard CB, Louis C, editors. *The molecular biology of insect disease vectors*. London: Chapman & Hall; 1997.
22. **Belloncik S, Charpentier G, Tian L.** Development of four cell lines from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). En: Maramorosch K, Mitsuashi J, editor. *Invertebrate cell culture: novel directions and biotechnology applications*. Enfield, NH: Science Publishers Inc.; 1997. p.3-10.
23. **Charpentier G, Belloncik S, Ducros G, Fontenille D, Tian L, Quiot JM.** Establishment and characterization of three cell lines from *Aedes triseriatus*. *J Medical Entomol* 1995;32:793-800.
24. **Dübendorfer A, Liebig B.** Cell differentiation in vitro and establishment of permanent, ecdysone-responsive cell lines from embryonic tissues of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J Insect Physiol* 1992; 86:991-1000.
25. **Sheppard CA, Lynn DE.** Immunoreactivities for calcium signaling components and neural-like properties of a Colorado potato beetle cell line. *Archiv Insect Biochem Physiol* 1996;33:197-209.
26. **Charpentier G, Tian L, Cossette J, Léry X, Belloncik S.** Characterization of cell lines developed from the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *In vitro Cell Dev Biol* 2002; 38:73-8.
27. **Tesh RB.** Establishment of two cell lines from the mosquito *Toxorhynchites amboinensis* (Diptera: Culicidae) and their susceptibility to infection with arboviruses. *J Med Entomol* 1980;17:338-43.
28. **Pudney M, Varma MGR.** *Anopheles stephensis* var. *Mysorensis*: establishment of a larval cell line (Mos. 43). *Exp Parasitol* 1971;29:7-12.

29. **Leibovitz A.** The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am J Hygiene* 1963;78:173-80.
30. **Grace TDC.** Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* 1962;195:788-9.
31. **Cali A, Kotter D, Orenstein J.** *Septata intestinalis* N.G., N. sp, and intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. *J Euk Microbiol* 1993;40:101-12.
32. **Schneider I.** Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Diptera, with emphasis on mosquitoes. En: Yunker CE, editor. *Arboviruses in arthropod cells in vitro*. Boca Raton, FL: CRC; 1969.
33. **Lee S, Hou RF.** Establishment of a cell line derived from embryos of the Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L). *J Invertebr Pathol* 1992;59:174-7.
34. **Hernández C, Reyes E, Rodríguez J, Olano V, Morales A, Bello F.** Comparación citogenética de *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) en cepas representativas de dos poblaciones colombianas. *Biomédica* 2000;20: 218-27.
35. **Ospina B.** Parámetros utilizados en la clasificación de los cromosomas. En: Garcia BE, editor. *Estudio citotaxonomico de los peces *Nematobrycon palmeri* y *Nematobrycon lacotei** (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 1980.
36. **Brown JE, Knudson DK.** Characterization of invertebrate cell line. III. Isozyme analyses employing cellulose-acetate electrophoresis. *In Vitro Cell Dev Biol* 1980;16:829-33.
37. **Rey G, Ferro C, Bello F.** Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000;95: 103-10.
38. **Landry BS, Dextraze L, Boivin G.** Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. *Genome* 1993;36:580-7.
39. **Coen JE, Strachan T, Dover G.** Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the *Melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J Molec Biol* 1982;158:17-35.
40. **Ballinger-Crabtree Mary, Black IV W, Miller B.** Use of genetic polymorphism by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47:893-901.
41. **Antolin M, Bosio C, Cotton J, Sweeney W, Strand M, Black IV W.** Intensive linkage mapping in a wasp (*Bracon hebetor*) and a mosquito (*Aedes aegypti*) with single-strand conformation polymorphism analysis of random amplified polymorphic DNA markers. *Genetics* 1996;143: 1727-38.
42. **de Sousa B, Panzetta de Dutari G, Gardenal C.** Genetic structure of *Aedes albifasciatus* (Diptera: Culicidae) populations in central Argentina determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction markers. *J Med Entomol* 1999;36: 400-4.
43. **Kambhampati S, Black IV W, Karamjit R.** Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): techniques, statistical analysis, and applications. *J Med Entomol* 1992;29:939-45.
44. **Pant U, Mourya DT, Sudeep AB, Benerjee K, Dhanda V.** New embryonic cell line from *Aedes krombeini* (H) (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell Dev Biol* 1992;28:567-8.
45. **Athawale SS, Sudeep AB, Barde PV, Jadi R, Pant U, Mishra AC et al.** A new cell line from the embryonic tissues of *Culex tritaeniorhynchus* and its susceptibility to certain flaviviruses. *Acta Virol* 2002;46:237-40.
46. **Rowley WA, Dorsey DC, Knowles MA.** The replication of two California serogroup viruses in a cell line from the mosquito *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1984;21:501-5.
47. **Haque MA, Hollister WS, Willcox A, Canning EU.** The antimicrosporidial activity of albendazole. *J Invertebr Pathol* 1993;62:171-7.
48. **Ditrich O, Kucerova Z, Koudela B.** *In vitro* sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* and *E. hellem* to albendazole. *J Euk Microbiol* 1994;41:37.
49. **Weiss LM, Michalakakis E, Coyle CM, Tanowitz HB.** The *in vitro* activity of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi*. *J Euk Microbiol* 1994;41:65.
50. **Bhat U, Singh KRP.** Structure and development of vesicles in larval tissue culture of *Aedes aegypti* (L). *J Med Entomol* 1969;6:71-2.
51. **Rai KS.** A comparative study of mosquito karyotypes. *Ann Entomol Soc Amer* 1963;56:160-70.
52. **McDonald PT, Rai KS.** Correlation of linkage groups with chromosomes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 1970;66:475-85.
53. **Luque J, Herráez A.** *Biología molecular e ingeniería genética*. Madrid, España: Helcourt; 2001.
54. **Mukhopadhyay J, Rangel EF, Kashinath, Munstermann LE.** Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its consequences. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:216-21.
55. **Léry X, LaRue B, Cossette J, Charpentier G.** Characterization and authentication of insect cell lines using RAPD markers. *Insect Biochem Mol Biol* 2003;33:1035-41.