

## Evaluación de tres técnicas citogenéticas diferentes en los estudios morfométricos del cariotipo de *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: *culicidae*)

Felio J. Bello<sup>1</sup>, Víctor A. Olano<sup>2</sup>, Alberto Morales<sup>3</sup>, Jorge Boshell<sup>4</sup>, Gloria Rey<sup>5</sup>, Felisa Durán<sup>6</sup>

### Resumen

Se efectuaron estudios morfométricos del cariotipo de *Aedes taeniorhynchus*, mosquito de interés médico-veterinario, por ser vector del virus de la encefalitis equina venezolana, tipo epidemo-epizoótico. En las preparaciones cromosómicas fueron utilizadas tres técnicas citogenéticas diferentes: *squash*, secado al aire y cultivos celulares. Estas se compararon entre sí para evaluar, en las metafases obtenidas, la longitud y morfología de los cromosomas. El número diploide de la especie fue de seis en todas las preparaciones cariológicas al utilizar cualquiera de los tres procedimientos; sin embargo, con la técnica de *squash*, los cromosomas mitóticos de cerebro fueron más cortos, discontinuos y con menor grado aparente de compactación de la cromatina; al utilizar la técnica de secado al aire, se obtuvieron mejores extendidos citológicos, cromosomas más separados y ligeramente de mayor longitud; en tanto que los resultados de mejor resolución, por la estructura, separación de homólogos y longitudes cromosómicas, se lograron con cultivos celulares.

### Summary

Morphometric studies of the *Aedes taeniorhynchus* mosquito karyotype are of veterinary medical interest because this mosquito is a vector of epidemo-epizootic Venezuelan equine encephalitis. Three different cytogenetic techniques were used for chromosome preparation: *squash*, air-drying and cell culture. These three techniques were compared to each other to evaluate the obtained metaphases' chromosome length and morphology. The diploid number of the species was 6 in all the cariological preparations when any one of the three procedures was used. However, with the squash technique, brain-cell mytotic chromosomes were shorter, discontinuous and had less apparent grades of chromatin compaction. When air-drying was used, better cytological extensions were obtained, the chromosomes being more separated and of a slightly greater length. The best resolution was obtained using cell culture because of the structure and separation of chromosome homology and length.

---

<sup>1</sup> M.Sc., investigador, Universidad de La Salle.

<sup>2</sup> Biólogo, Laboratorio de Entomología, INS.

<sup>3</sup> M.Sc., Laboratorio de Entomología, INS.

<sup>4</sup> Médico, Laboratorio de Virología, INS.

<sup>5</sup> Bacterióloga, Laboratorio de Virología, INS.

<sup>6</sup> Estudiante de pregrado, Universidad de La Salle.

*Aedes taeniorhynchus* es un mosquito de interés médico-veterinario por ser eficiente vector del virus de la encefalitis equina venezolana, tipo epidemo-epizoótico. El insecto presenta una vasta distribución en el continente americano (1) y en Colombia se ha encontrado en las costas del Atlántico y del Pacífico; sin embargo, en 1985, fue detectado en el interior del país, concretamente en Ambalema, Tolima (2).

Los mosquitos son excelentes materiales biológicos para estudios citogenéticos por varias razones: el número diploide es bajo ( $2n=6$ ), en todas las especies estudiadas a excepción del género *Chagasia*, cuyo complemento cromosómico es de 4 pares ( $2n=8$ ) (3); Los cromosomas metafásicos son relativamente grandes y fácilmente identificables; en algunas especies, principalmente del género *Anopheles*, los cromosomas politécnicos son de excelente resolución, con características bien definidas y patrones de bandas consistentes; el escaso número de cromosomas por núcleos, además de la relativa facilidad para los extendidos, hace simple el estudio de numerosas aberraciones, tales como inversiones, las cuales son típicas en ciertas poblaciones (4).

El dramático desarrollo de la resistencia por parte de los mosquitos vectores a los insecticidas en todo el mundo y la inequívoca correlación genética que ello representa, ha creado la necesidad de intensificar las investigaciones cromosómicas y moleculares en estos insectos (3).

Una tabulación de estudios cariológicos realizada por Rai (1980) (5) en investigaciones desarrolladas con 48 especies de mosquitos del género *Aedes*, observó que todas las especies presentan tres pares de cromosomas homomórficos, uno de los cuales es más corto que los otros dos y éstos a su vez se diferencian entre sí, en algunas especies, por la posición del centrómero y la constricción secundaria. El par más pequeño es el que determina el sexo (6, 7). A pesar de que el cariotipo de la mayoría de las especies del

género *Aedes* son similares, éste se puede distinguir por sus características cromosómicas (5).

Bello *et al.* (8), utilizando cultivos celulares, establecieron las características cromosómicas de *Aedes taeniorhynchus*, en donde el par 1 es metacéntrico y corto comparado con los pares 2 y 3 submetacéntricos y relativamente más largos; sin embargo, la diferencia de longitud entre estos dos últimos no es significativa.

En el presente estudio se evaluaron tres técnicas citogenéticas diferentes, cada una de las cuales se utilizaron separadamente en la preparación de cromosomas mitóticos de *Aedes taeniorhynchus*, se determinaron las características morfológicas de éstos y se efectuaron las mediciones cromosómicas estándar, cuyos resultados se compararon en cada uno de los procedimientos.

### Materiales y métodos

**Material biológico:** las larvas de IV estadio de *Aedes taeniorhynchus* que se utilizaron en este estudio, fueron tomadas de las colonias establecidas en los insectarios del INS y la Universidad De La Salle, correspondientes a la cepa Barranquilla (9).

Los cultivos celulares de esta especie se obtuvieron de tejidos embrionarios de acuerdo con el procedimiento descrito por Bello *et al.* (1995) (8).

**Técnica del squash:** se utilizaron larvas de IV estadio, las cuales fueron colocadas en solución de colchicina al 0,1% durante 1 hora. La disección de la larva se efectuó en presencia del reactivo de Belar; la cabeza fue removida con la ayuda de agujas y pinzas finas, observando con el auxilio del estereoscopio; el cerebro que consta de dos lóbulos, se aisló del resto de la cabeza y, luego, se trasladó a una lámina a la que previamente se le colocó una gota de Carnoy (metanol y ácido acético 3:1) en donde se fijó por un tiempo de 10 minutos; se adicionó a la preparación una gota de orceína-lactoacética durante 15 minutos. La laminilla se colocó encima del micropreparado y se procedió a efectuar el *squash* o presión

fuerte del dedo pulgar sobre la laminilla. Las mejores metafases se fotografiaron y se procedió a realizar las mediciones estándar para cada uno de los cromosomas de los cariotipos (4, 10).

**Técnica del secado al aire:** las larvas de IV estadio, sometidas previamente a la acción de 0,1% de colchicina por un tiempo de una hora, se colocaron individualmente en una lámina excavada que contenía una gota del reactivo de Belar; con el auxilio de agujas finas se removió la cabeza de la larva, en donde se disectó el cerebro para ser trasladado posteriormente a un tubo de centrífuga que contenía 5 mL de solución salina. Siguiendo el procedimiento anterior y cuando se completaron 20 cerebros, se procedió a centrifugar el contenido a 1.000g durante 10 minutos; el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió con 10 mL de solución hipotónica de cloruro de potasio al 0,56%, dejándose en reposo por 40 minutos, al cabo del cual se centrifugó. El sobrenadante se descartó y al precipitado se le adicionó Carnoy recién preparado en donde se resuspendieron las células y se dejó actuar por 30 minutos; después de la centrifugación, se hicieron tres lavados sucesivos con el mismo fijador; finalmente se resuspendió el precipitado en 1 mL de Carnoy, el cual se utilizó para preparar los extendidos celulares que luego se dejaron secar al aire. La coloración se hizo con solución Giemsa al 2% (10).

**Técnica citogenética con cultivos celulares:** a partir de explantes de tejidos embrionarios se obtuvieron cultivos celulares de *Aedes taeniorhynchus* (8). A los cultivos se les adicionó colchicina a una concentración de 0,6 µg/mL por un tiempo de 4 horas, los cuales fueron sacados de incubación al término del tiempo, se removió la monocapa y se centrifugó a 1.000g por 10 minutos; se botó el sobrenadante y al precipitado se le agregó KCl a una concentración de 0,075 M, se agitó con una pipeta Pasteur y se dejó actuando por 30 minutos, al cabo de este tiempo, se volvió a centrifugar y siguiendo el procedimiento anterior, se adicionó Carnoy por 15 minutos. Se hicieron

tres lavados seguidos con la misma sustancia; finalmente, en una cantidad de un mL de Carnoy se goteó la suspensión celular sobre láminas limpias y desengrasadas. La coloración se efectuó con Giemsa al 2% (11-13).

**Mediciones cromosómicas:** se analizaron las metafases correspondientes y se seleccionaron 20 cariotipos de *Aedes taeniorhynchus* obtenidos con cada una de las técnicas citogenéticas empleadas. Se efectuaron mediciones estándar del brazo corto (p), brazo largo (q), relación de brazos (q/p) y (p/q), longitud total (LT), largo relativo (LR); este dato se obtuvo dividiendo el valor de la longitud total de cada cromosoma sobre 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, el valor absoluto promedio de longitud (VAPL) se registró al relacionar la longitud total de cada cromosoma sobre la longitud del cromosoma más pequeño del genoma (14).

## Resultados

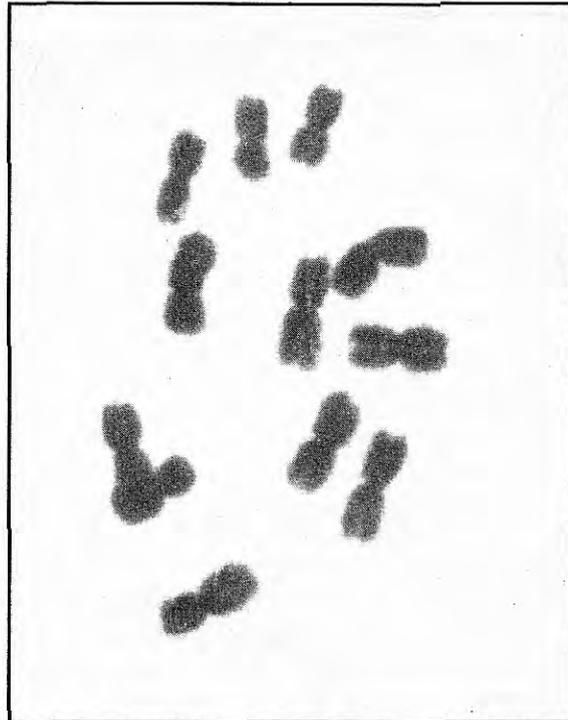
El número diploide de *Aedes taeniorhynchus*,  $2n=6$ , coincide en todos los cariotipos al utilizar cualquiera de las tres técnicas citogenéticas. El



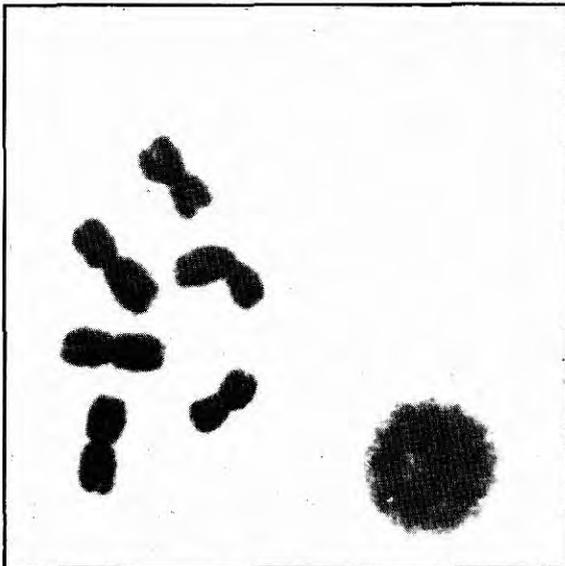
**Figura 1.** Cromosomas mitóticos de cerebro de *Aedes taeniorhynchus*. Técnica del "squash".



**Figura 2.** Cromosomas mitóticos de cerebro de *Aedes taeniorhynchus*. Técnica de secado al aire.



**Figura 4.** Número tetraploide de cromosomas de *Aedes taeniorhynchus*. Cultivos celulares, pase 35.



**Figura 3.** Cromosomas metafásicos de *Aedes taeniorhynchus*. Técnica de cultivos celulares.

número fundamental es de 12 en las metafases analizadas. En las figuras 1 a 4 se observa, en forma representativa, el número y la morfología cromosómica de la especie al emplear cada uno de los procedimientos.

En las tablas 1, 2 y 3, se muestran los promedios de las longitudes cromosómicas de *Aedes taeniorhynchus*, cuyos cariotipos han sido obtenidos con las técnicas de *squash*, secado al aire y cultivos celulares, respec-

tivamente. En la figura 5 se observa, en forma comparativa, la longitud total de cada uno de los pares cromosómicos en los cariotipos, preparados con cada una de las técnicas empleadas.

Para la clasificación de los cromosomas se utilizaron los datos directos de las mediciones de los brazos, teniendo en cuenta la posición del centrómero, en donde el cromosoma 1 es metacéntrico, el 2 y 3 son submetacéntricos y relativamente más largos. También se utilizaron los parámetros propuestos por Zimmerman (15), Levan (16) y Ospina de Dulce (14), en forma comparativa (tabla 4). Según Zimmerman, el par 1 es metacéntrico y los pares 2 y 3 son submetacéntricos. Levan y Ospina de Dulce clasifican los tres pares cromosómicos como metacéntricos.

**Discusión**

El número diploide de 6 en *Aedes taeniorhynchus* en todas las preparaciones cromosómicas, al utilizar cualquiera de las tres técnicas

**Tabla 1.** Promedios de las longitudes cromosómicas de *Aedes taeniorhynchus* al emplear la técnica de "squash".

	p	q	LT	LR	q/p	p/q	IC	VAPL	Met.
Cromosoma 1	0,42	0,42	0,90	0,27	1,0	1,0	0,46	1,0	20
Cromosoma 2	0,47	0,59	1,12	0,33	1,2	0,8	0,42	1,1	20
Cromosoma 3	0,70	0,82	1,59	0,35	1,1	0,8	0,43	1,2	20

p= brazo corto, q= brazo largo, LT= longitud total, LR= longitud relativa, IC= índice centromérico, VAPL= valor absoluto de longitud, Met= metafases.

**Tabla 2.** Promedios de las longitudes cromosómicas de *Aedes taeniorhynchus* al emplear la técnica de secado al aire.

	p	q	LT	LR	q/p	p/q	IC	VAPL	Met.
Cromosoma 1	0,64	0,64	1,33	0,29	1,0	1,0	0,47	1,0	20
Cromosoma 2	0,63	0,79	1,48	0,33	1,2	0,8	0,42	1,1	20
Cromosoma 3	0,70	0,82	1,59	0,35	1,1	0,8	0,43	1,2	20

p= brazo corto; q= brazo largo; LT= longitud total; LR= longitud relativa; IC= índice centromérico; VAPL= valor absoluto de longitud; Met= metafases.

**Tabla 3.** Promedios de las longitudes cromosómicas de *Aedes taeniorhynchus* al emplear la técnica de cultivos celulares.

	p	q	LT	LR	q/p	p/q	IC	VAPL	Met.
Cromosoma 1	0,63	0,63	1,32	0,27	1,0	1,0	0,47	1,0	20
Cromosoma 2	0,77	0,87	1,71	0,35	1,1	0,8	0,45	1,3	20
Cromosoma 3	0,79	0,90	1,78	0,36	1,1	0,9	0,46	1,3	20

p= brazo corto, q= brazo largo, LT= longitud total; LR= longitud relativa; IC= índice centromérico; VAPL= valor absoluto de longitud; Met= metafases.

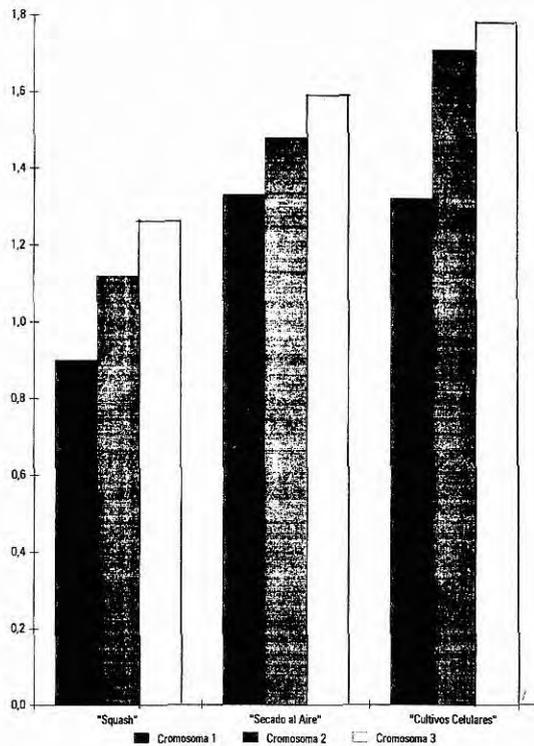
**Tabla 4.** Patrones de clasificación de los cromosomas.

Clasificación	Autor y rango de valores utilizados		
	Levan q/p	Zimmerman q/p	Ospina de Dulce I.C.
Metacéntrico	1,0 - 1,7	1	0,5 - 0,4
Submetacéntrico	1,7 - 3,0	1,1 - 2	0,4 - 0,3
Subtelocéntrico	3,0 - 7,0	-	0,3 - 0,2
Acrocéntrico	7,1	2,1	0,2 - 0,05
Telocéntrico	-	-	menos de 0,05

citogenéticas, coincide con el reporte de Bello *et al.* (1995) (8) para esta especie, característica que es común para la casi totalidad de los mosquitos (3); sin embargo, al comparar la morfología del cariotipo, observamos que con la técnica de *squash*, los cromosomas pre-

sentan la tendencia, en la mayoría de las metafases a ser ligeramente discontinuos y con menor grado aparente de compactación de la cromatina, mientras que con la técnica del secado al aire ésta es uniforme y se facilita en los extendidos citológicos una mejor separación de los cromosomas, a pesar de lo anterior, en donde se alcanza una mejor resolución es al utilizar la técnica de cultivos celulares, ya que la disposición morfológica de los cromosomas es homogénea y pueden nítidamente diferenciarse las estructuras primarias.

Al emplear la técnica de *squash* para obtener cromosomas observamos "tres bivalentes somáticos" en la mayoría de las preparaciones mitóticas de cerebro; esto se debe básicamente al apareamiento somático, el cual es común en



**Figura 5.** Comparación de las longitudes cromosómicas totales de *Aedes taeniorhynchus*.

Diptera, pero en los Culicini es realmente excepcional por la fuerte y, más o menos, permanente asociación de los cromosomas homólogos (17). Esta situación no se presenta en cromosomas metafásicos cuando se emplean las técnicas de secado al aire y de cultivos celulares, ya que los cromosomas homólogos se pueden apreciar bien separados, sin ningún grado de apareamiento, de tal forma que en el cariotipo observamos seis cromosomas individuales.

Con los cultivos celulares primarios, que han sido obtenidos directamente de explantes de huevos embrionados, se realizaron preparaciones cromosómicas que correspondieron a las características del cariotipo de *Aedes taeniorhynchus* e igual sucedió con las preparaciones citológicas a nivel de pases bajos, mientras que en los pases altos, 30 en adelante, observamos poliploidías en menor proporción (figura 4), esta situación se explica

por la transformación genética que sufren las células después de replicarse el cultivo durante mucho tiempo, lo que se traduce en inmortalidad celular, que es sintomático de la conversión del cultivo en una línea celular de crecimiento continuo.

Para lograr resultados satisfactorios con la técnica de secado al aire, es necesario realizar una buena disociación mecánica de las células de los ganglios cerebrales, que facilite la acción de los tratamientos en el desarrollo del procedimiento, pues, contrariamente, la compactación celular, presentes en forma de aglomerados, impide la correcta difusión de la solución hipotónica y del fijador y, por ende, frustra la preparación de buenas metafases.

Los datos promedios de las mediciones cromosómicas en los cariotipos obtenidos con el método de *squash*, muestran (tabla 1) que los valores tomados directamente, tales como p, q, y LT, son significativamente más cortos con este procedimiento comparado con los promedios obtenidos con los cromosomas preparados mediante la técnica de secado al aire y de cultivos celulares (tabla 2 y 3), también, entre estos dos últimos procedimientos, las diferencias de longitudes son notorias a nivel de los cromosomas 2 y 3, presentándose valores relativamente mayores con la técnica de cultivos celulares; en parte esta situación se explica por la facilidad de manipulación que ofrece el material *in vitro* y por la acción directa de los pretratamientos sobre las células, alcanzándose una capacidad máxima en los extendidos cromosómicos.

### Agradecimientos

A COLCIENCIAS, la Universidad De La Salle y al Instituto Nacional de Salud de Colombia por la financiación al presente trabajo.

A los hermanos José Vicente Henry V. y Luis Humberto Bolívar R., Rector y Vicerrector Académico de la Universidad De La Salle respectivamente, por el apoyo brindado.

### Referencias

1. Forattini OP. Entomología médica. Sao Paulo: Universidad de Sao Paulo, 1965.

2. **Olano VA.** Hallazgo de *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) en un lugar del municipio de Ambalema, departamento de Tolima (Colombia) (Diptera: culicidae) 1985;5:26.
3. **Clements AN.** The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction. Volumen I. Chapman & Hall. First Edition 1992;509.
4. **French WL, Baker RH, Kitzmiller JB.** Preparation of mosquito chromosomes. Mosquito News 1962;22:377-384.
5. **Rai KS.** Evolutionary cytogenetics of *Aedine* mosquitoes. Genetics 1980;66:475-485.
6. **McDonald PT, Rai KS.** Correlation of linkage group with chromosomes in the mosquito *Aedes aegypti*. Genetics 1970;66:475-485.
7. **Wood RJ, Newton ME.** Sex-ratio distortion caused by meiotic drive in mosquitoes. Am Naturalist 1991; 137:379-391.
8. **Bello FJ, Boshell J, Rey G, Morales A, Olano VA.** Initiation of primary cell cultures from embryos of the mosquitoes *Anopheles albimanus* and *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: culicidae). Mem Inst Oswaldo Cruz, Río de Janeiro 1995;90:547-551.
9. **Bello FJ, Olano VA, Morales A, Cassalethe, Giraldo L, Hernández C.** Establecimiento y mantenimiento de una colonia de *Aedes taeniorhynchus* (Diptera: culicidae) cepa Barranquilla, Colombia. Biomédica 1994;14:69-76.
10. **Bello FJ, Ospina B, Giraldo A, Duque S.** Comparación citogenética de *Aedes aegypti* en dos localidades colombianas. Revista de la Facultad de Ciencias, Universidad Javeriana 1987;1:11-27.
11. **Hajime I, Mitsuhashi J.** Characterization of a new continuous cell line from silkworm (*Bombyx mori*) embryos. Appl Ent Zool 1988;23:8-14.
12. **Lee S, Hou RF.** Establishment of a cell line derived from embryos of the Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). J Invertebr Pathol 1992;59:174-177.
13. **Tesh RB, Modi GB.** Development of a continuous cell line from the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: psychodidae) and its susceptibility to infection with arboviruses. J Med Entomol 1983;20:199-202.
14. **Ospina de Dulce B, García BE.** Estudio citotaxonomico de los peces *Nematobrycon palmeri* y *Nematobrycon lacotei* (tesis). Bogotá: Universidad Javeriana, 1980.
15. **Zimmerman EG, Shivonen G.** Chromosomal banding pattern and idiogram of the cotton rat *Sigmodon arixonae* (Rodentia: muridae). Chromosoma 1973; 41:85-91.
16. **Levan A, Fredga K, Sanaberg A.** Nomenclature for centromeric positions on chromosomes. Hereditas 1964;52:201.
17. **Newton ME, Southern DI, Wood RJ.** X and Y chromosomes of *Aedes aegypti* (L) distinguished by Giemsa c-banding. Chromosoma 1974;49:41-49.