

**ARTICULO ORIGINAL**

## **Estudio de cultivos celulares primarios de *Psorophora confinnis* (Díptera: Culicidae)**

Felio J. Bello<sup>1</sup>, Jaime A. Rodríguez<sup>1</sup>, Alberto Morales<sup>2</sup>, Víctor A. Olano<sup>2</sup>

### **Resumen**

Con el propósito de obtener una línea celular de *Psorophora confinnis* (Arribalzaga, 1891) para estudios de susceptibilidad a infecciones con arbovirus, se iniciaron los cultivos primarios de esta especie, vectora del virus de la encefalitis equina venezolana, tipo epidemo-epizoótico. A partir de huevos embrionados, larvas de primer estadio recién eclosionadas y ovarios de hembras adultas, se realizaron explantes por separado de tejidos embrionarios en diversos medios de cultivos, suplementados con 20% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos y antimicóticos al 1%. La esterilización del material biológico se efectuó mediante la inmersión de éste en diversas sustancias, tales como: hipoclorito de sodio al 1,6%, etanol al 70% y una solución de 0,25% de cloruro de mercurio disuelto en 70% de etanol. El crecimiento celular se inició sólo en el medio MM/VP12 en un tiempo promedio de 62 días después de efectuadas las siembras, mediante la proliferación de colonias aisladas procedentes de tejidos embrionarios, y también a partir de las terminaciones de los fragmentos larvales. La evolución del crecimiento celular hasta la formación de la monocapa confluyente fue supremamente lenta y sólo se alcanzó a los 8 meses post-explante, presentando ésta una morfología celular predominantemente epiteloide. No fue exitoso el crecimiento celular a partir de los tejidos ováricos de hembras adultas. La iniciación del crecimiento celular en esta especie presentó tiempos diferentes comparados con los empleados en los cultivos celulares de otros mosquitos, lo cual indica que a pesar de utilizarse una metodología similar en el proceso para obtener cultivos primarios, las adaptaciones celulares a las condiciones físicas, ambientales y nutricionales son diferentes en cada una de las especies. Este es el primer informe de cultivos celulares de una especie de mosquito perteneciente al género *Psorophora*.

**Palabras clave:** mosquitos, *Psorophora confinnis*, cultivos celulares, medios de cultivo.

### **Primary *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) cell culture studies**

#### **Abstract**

With the purpose of obtaining a *Ps. confinnis* cell line for arbovirus infection susceptibility studies, the primary cultures of this species were initiated, this being a vector of the

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigaciones en Entomología, Biología Celular y Genética, Departamento de Química y Biología, Universidad De La Salle, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

Venezuelan Equine Encephalitis virus, epidemo-epizootic type. Starting from embryonated eggs, neonate larvae and adult females' ovaries, embryonic tissue explants in diverse culture media (supplemented with 20% foetal bovine serum and a mixture of antibiotics and 1% antimycotics) were carried out. Biological material was sterilised by immersion in different substances, such as 1.6% sodium hypochloride, 70% ethanol and 0.25% mercuric chloride solution in 70% ethanol. Cellular growth only began after 62 days of incubation in MM/VP12 medium; proliferation of isolated colonies also started from larval fragments' cut ends. Evolution of cellular growth until confluent monolayer formation was extremely slow and was only reached 8 months post-explant, presenting a predominantly epithelioid cellular morphology. Cell growth was not successful starting from adult female ovarian tissue. Initiation of this specie's cell growth presented different times compared to that spent on cell cultivation of other mosquitoes, which indicates that, in spite of using similar methodology in the process in order to obtain primary cell cultures, cell adaptations to physical, environmental and nutritional conditions are different for each one of the species. This is the first report of cell cultures of a species of mosquito belonging to the *Psorophora* genus.

**Key words:** mosquitoes, *Psorophora confinnis*, cell cultures, culture media.

## Introducción

*Psorophora confinnis* está catalogado como eficiente vector del virus de la encefalitis equina venezolana, tipo epidemo-epizootico (1). El mosquito presenta una amplia distribución en las Américas, encontrándose en las regiones noreste, centro y sur de los Estados Unidos, alcanzado también Centro América y las Antillas; en Sur América se encuentra en la mayor parte del continente llegando hasta el norte de Argentina, se exceptúan los países de Ecuador, Perú, Chile y Argentina (parte central y sur) (2). En Colombia se tiene registro de la presencia del insecto en los departamentos de Norte de Santander, Santander, Tolima, Boyacá, Meta, Huila, Cundinamarca, Córdoba, Guajira (3), Arauca (4), Casanare (Brote de encefalitis equina venezolana y encefalitis equina del este en Casanare. Informe de evaluación entomológica. Laboratorio de Entomología y Laboratorio Nacional de Referencia. Instituto Nacional de Salud, 1998) y Amazonas (Colección de referencia, Laboratorio de Entomología, Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia. Instituto Nacional de Salud, 1996).

Desde la obtención de la primera línea celular, la cual fue establecida por Grace en 1966 (5) a partir de larvas de *Aedes aegypti*, diversas líneas celulares de mosquitos han sido establecidas

(Peleg 1968 (6), Bhat y Singh 1969 (7), Varma y Pudney 1969 (8), Cahoon et al. 1978 (9), Tesh 1980 (10), Rowley et al. 1984 (11), Oelofsen et al. 1990 (12), Pant et al. 1992 (13), Bello et al. 1995, 1997 (14,15), entre otros autores). En general, las líneas celulares establecidas a partir de insectos vectores corresponden principalmente a los órdenes: Díptera, Lepidóptera, Homóptera, Hemíptera y Orthóptera (16,17). En la iniciación de los cultivos celulares de mosquitos se usa una metodología similar a la empleada en el establecimiento de cultivos celulares de mamíferos (18); sin embargo, para cada especie de mosquito que se utilice para obtener cultivos celulares se requiere modificar y estandarizar condiciones particulares en lo referente a selección de tejidos para explantes iniciales, medios de cultivos, suplementos nutricionales adicionales al medio, pH, presión osmótica, temperatura de incubación y mecanismos para remover las células (14).

Las líneas celulares de insectos se consideran una técnica útil para estudios fundamentales de fisiología celular, genética y bioquímica e igualmente son empleadas como sustratos para aislamiento e identificación de arbovirus, estudios de parásitos, producción de virus recombinantes que se utilizan en control biológico, preparación

de antígenos, evaluación de insecticidas y atenuación de la infección viral (16,17,19-24).

En este trabajo se informa por primera vez, sobre el proceso de iniciación del crecimiento y la caracterización de los cultivos celulares primarios, obtenidos a partir de huevos embrionados y larvas de primer estadio recién eclosionadas de *Ps. confinnis*, con el fin de poder desarrollar subcultivos hasta establecer una línea celular que se utilizara en estudios de susceptibilidad a infecciones con arbovirus.

### **Materiales y métodos**

**Material biológico.** Los huevos embrionados, las larvas de primer estadio recién eclosionadas y los ovarios de hembras adultas, fueron obtenidos de una colonia de *Ps. confinnis*, cepa Loric Córdoba, Colombia, establecida y mantenida por varias generaciones en el insectario del laboratorio de investigaciones en Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Salle (25).

**Medios de cultivo.** En la iniciación de cultivos celulares primarios se utilizaron diferentes medios de cultivo: MM(26), VP12 (8), MK (27), MM/VP12(8), MK/VP12 (28), MEM EAGLE (Gibco) y Grace (5). Cada uno de estos medios fue suplementado con 20% de suero fetal bovino y una mezcla de antibióticos (penicilina 100 unids./ml y estreptomycin 100 mg/ml) y antimicótico (anfotericina B). El pH de los medios anteriormente señalados estuvo en el rango de 6,7 a 6,9.

**Esterilización de las muestras.** Huevos: cerca de 500 huevos de 5, 6, 8 y 10 días de incubación fueron periódicamente utilizados, en forma separada, para iniciar los cultivos. Éstos se tomaron de posturas efectuadas sobre algodón envuelto en gasa, los cuales fueron transferidos a un tubo plástico de centrifuga de 50 ml, luego se adicionó una solución de hipoclorito de sodio al 1,6%, que se dejó actuar sobre la superficie de los huevos por un tiempo de 15 minutos, manteniendo agitación continua. En forma similar al procedimiento anterior, se adicionó etanol al 70% finalmente se lavaron los huevos 3 veces con agua destilada estéril (10). Larvas de primer

estadio recién eclosionadas: 300 huevos de 10 días de incubación obtenidos mediante el procedimiento anterior fueron colocados en un tubo de centrifuga que contenía previamente 10 ml de solución salina de Rinaldini, en el cual se dejaron toda la noche, facilitándose de esta manera la eclosión de un gran número de larvas, las cuales en las primeras horas del día siguiente fueron transferidas a una caja de Petri estéril donde se cortaron en varios fragmentos con la ayuda de un bisturí, realizándose esta labor al interior de una cabina de flujo laminar (9). Ovarios: 10 hembras adultas de 3 a 5 días de edad fueron colocadas por 2 minutos en una solución de 0,25% de cloruro de mercurio disuelto en etanol al 70%, luego se lavaron en agua destilada estéril, y finalmente se disectaron con la ayuda de un estereoscopio al interior de una cabina de flujo laminar (18), (29).

**Iniciación de cultivos primarios.** Al finalizar la técnica de esterilización de los huevos embrionados, se realizó un homogenizado de la muestra en 1 ml de medio de crecimiento. La suspensión se llevó a un frasco de plástico de 25 cm<sup>2</sup> para cultivos de tejidos, el cual contenía 5 ml del medio enriquecido, que correspondió a cada uno de los utilizados en el presente trabajo. Las células fueron incubadas a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ , sin atmósfera de CO<sub>2</sub> y diariamente se observaron con la ayuda de un microscopio invertido. Los fragmentos larvales y los ovarios enteros y fraccionados se llevaron en forma independiente a frascos de cultivo con el medio de crecimiento elegido y de inmediato fueron incubados a una temperatura de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ .

### **Resultados**

**Iniciación de los cultivos primarios a partir de huevos y larvas de primer estadio recién eclosionadas.** El crecimiento celular en los explantes de tejidos embrionarios y de fragmentos larvales se inició en promedio a los 62 días posteriores a la siembra por separado de éstos. El medio de cultivo donde se observó proliferación celular fue el MM/VP12. La principal fuente para la obtención de cultivos primarios se dio a partir de la proliferación de colonias aisladas, provenientes de células adheridas al frasco,

derivadas de tejidos embrionarios y de algunos fragmentos larvales (figuras 1 y 2), los cuales comenzaron a mostrar en su parte periférica la formación de pequeñas vesículas (figura 3), que con el transcurrir del tiempo fueron aumentando paulatinamente de tamaño hasta que reventaron, disgregando células que luego se adhirieron al fondo del frasco y comenzaron a crecer. Otros fragmentos pegaron directamente en la superficie del frasco y a su alrededor iniciaron el crecimiento células de formas epitelioides, las cuales al evolucionar alcanzaron espacios considerables, contribuyendo de esta manera a la formación de la monocapa. Esta se obtuvo en promedio después de 8 meses de sembrados los tejidos embrionarios y los fragmentos larvales. Los huevos embrionados que mejores resultados mostraron por su viabilidad y capacidad para crecer y proliferar, fueron los de 8 y 10 días de incubación. En los otros medios de cultivo no se observó crecimiento celular.

Iniciación de cultivos primarios a partir de ovarios. El crecimiento se limitó sólo a algunas células sueltas, disgregadas de la masa de los ovarios, sembradas en el medio MM/VP12, las cuales a la segunda semana post-explante presentaron su mayor proliferación sin embargo, fueron perdiendo viabilidad hasta que finalmente a la cuarta semana, las células degeneraron. Los tejidos ováricos se han mantenido inmersos en el medio de cultivo, sin lograr adherirse a la superficie del frasco sin embargo, en ellos se observaron pulsaciones o movimientos contráctiles característicos que evidenciaron actividad metabólica no obstante, después de 7 meses de explantados los ovarios, ha sido nulo el crecimiento celular a partir de estos tejidos (figura 4).

Morfología celular. Cuando las células provenientes de los tejidos embrionarios y de los fragmentos larvales, comenzaron a crecer y multiplicarse, se observó una población celular heterogénea, similar en ambos tejidos, conformada por tipos epitelioides y fibroblástoides en una mayor proporción, no obstante, se registraron formas esféricas pequeñas, gigantes irregulares y alargadas discontinuas en menor número (figura 5). Al configurarse la monocapa

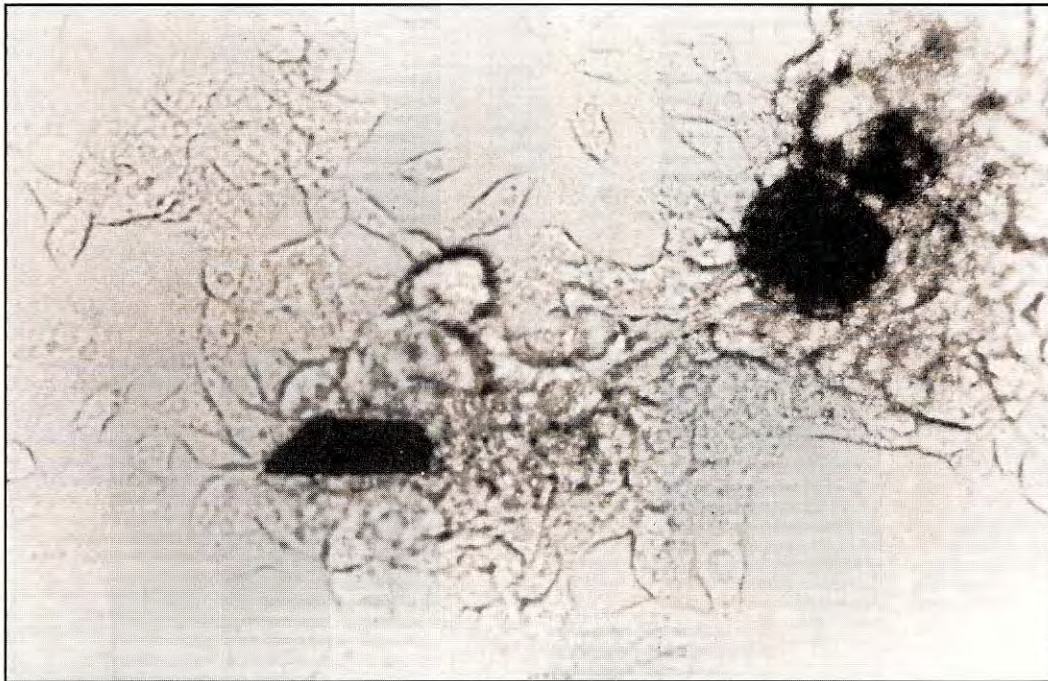
confluente, derivada de cada uno de los tejidos mencionados, las células epitelioides fueron predominantes (figura 6).

### Discusión

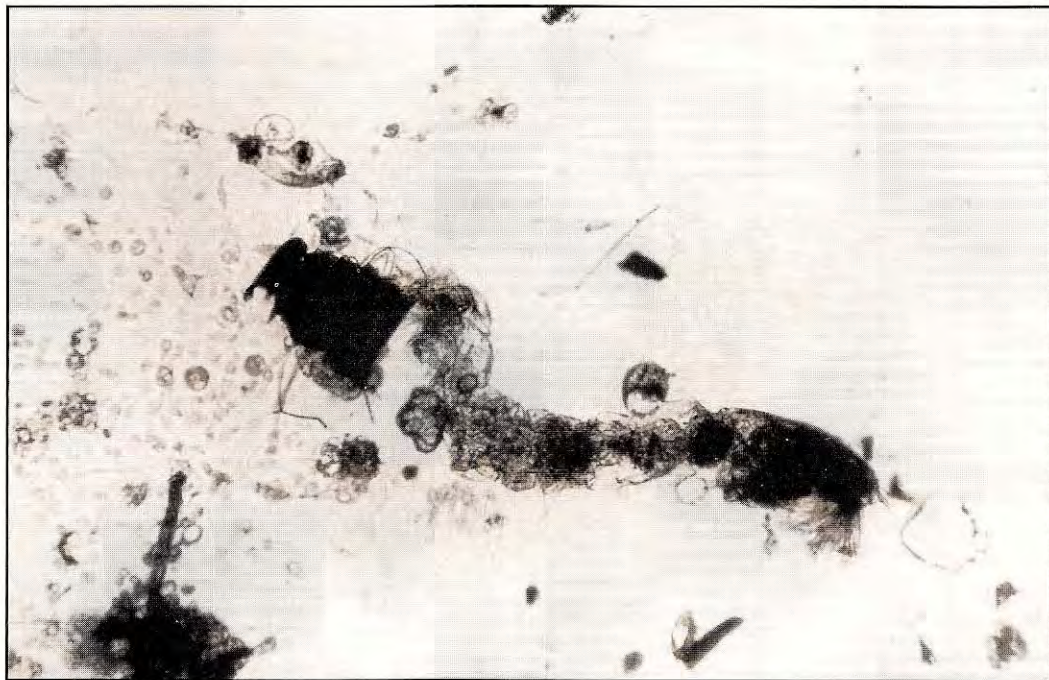
La obtención de una monocapa confluente a partir de los cultivos celulares primarios de *Ps. confinnis*, se presentó en promedio a los 8 meses posteriores a la siembra de los explantes de tejidos embrionarios; esta situación no es frecuente en cultivos de mosquitos, en los cuales los resultados del crecimiento celular hasta llenar la superficie del frasco registraron tiempos menores, tal como ocurrió en líneas celulares derivadas de algunas especies pertenecientes a los géneros *Toxorhynchites*, *Culex*, *Aedes* y *Anopheles* (9,10,12,13,18, 28-30). Probablemente, el estado de inactividad relativa en los primeros meses y el lento crecimiento celular de los cultivos en el presente trabajo, se debieron a la poca capacidad de adaptación de estos tejidos a las condiciones nutritivas del medio, aunque, finalmente, después de un largo periodo de permanencia en el mismo, las células lograron asimilar y utilizar sus componentes.

La utilización de tejidos embrionarios derivados de huevos y larvas de primer estadio recién eclosionadas, además de los tejidos ováricos de hembras adultas, permitieron comparar, bajo las condiciones metodológicas definidas en el presente trabajo, el grado de efectividad de cada uno de ellos en el proceso de iniciación de los cultivos primarios para esta especie. Los resultados en cuanto a crecimiento celular y formación de la monocapa fueron exitosos en los primeros tejidos, utilizando el medio MM/VP12, a pesar del tiempo relativamente prolongado transcurrido para alcanzar la confluencia; no ocurrió lo mismo con los tejidos ováricos, en los cuales el crecimiento se produjo sólo en células sueltas del tejido original en las etapas tempranas de las siembras y en presencia también del medio MM/VP12; éstas células posteriormente perdieron viabilidad y degeneraron. Los fragmentos de ovarios presentaron movimientos contráctiles durante más de cuatro meses, lo que en cierta forma evidenció actividad metabólica; sin embargo, éstos no se adhirieron a la superficie del frasco y tampoco proliferaron células y/o vesículas



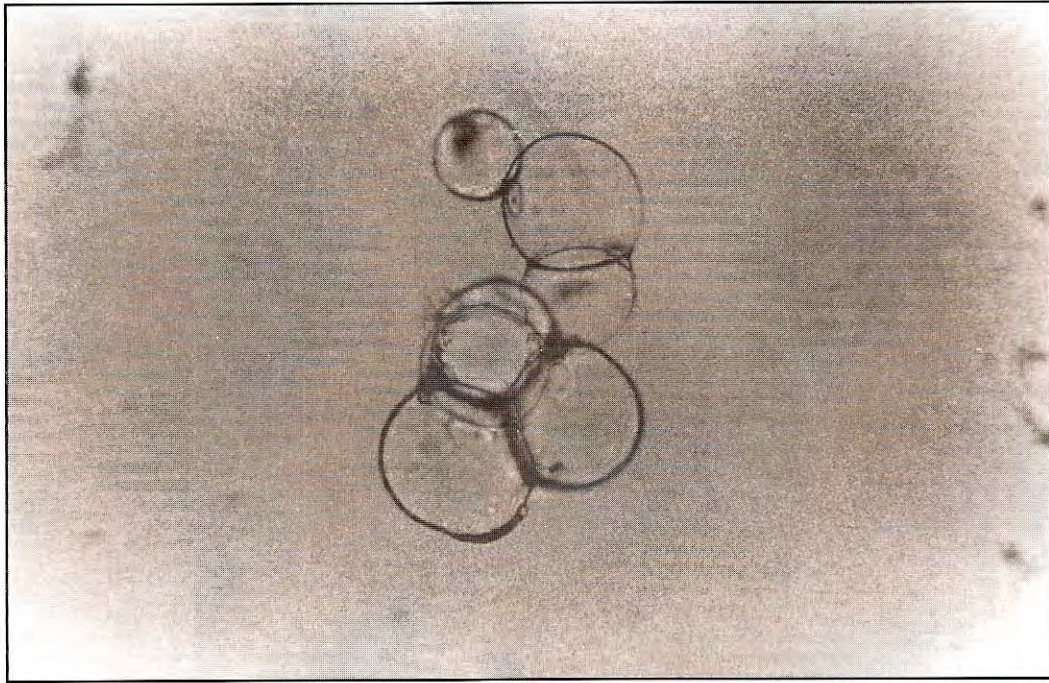


**Figura 1.** Iniciación del crecimiento celular a partir de colonias aisladas provenientes de huevos embrionados, 200X



**Figura 2.** Fragmento larval con células periféricas en activo crecimiento, 100X



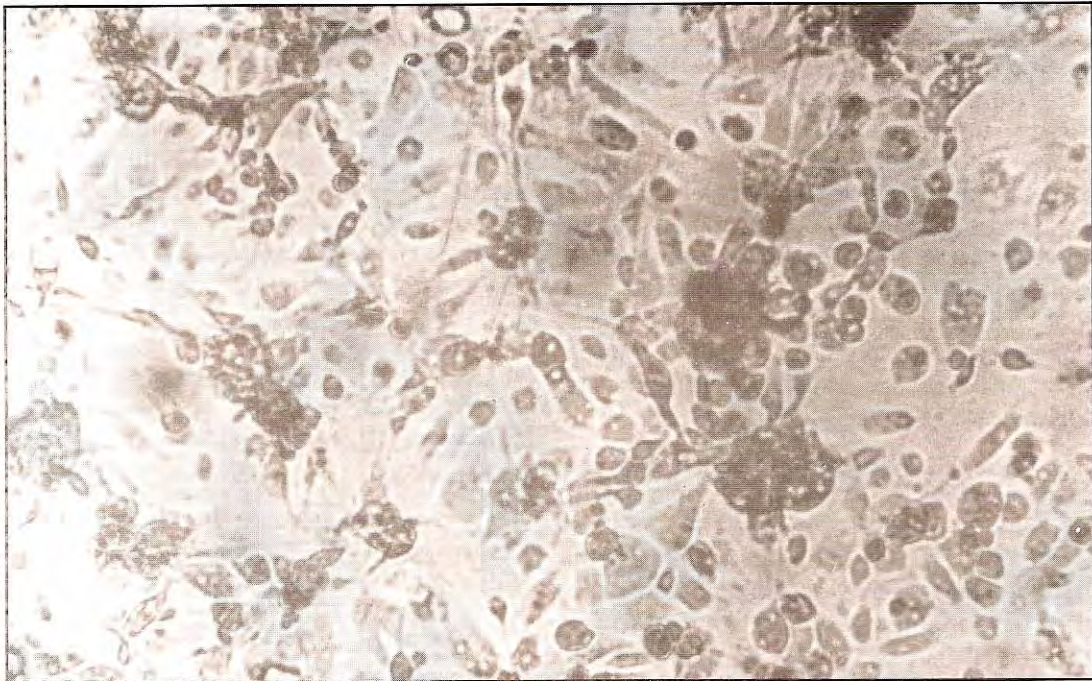


**Figura 3.** Vesículas en suspensión como fuente importante de disgregación celular, 40X

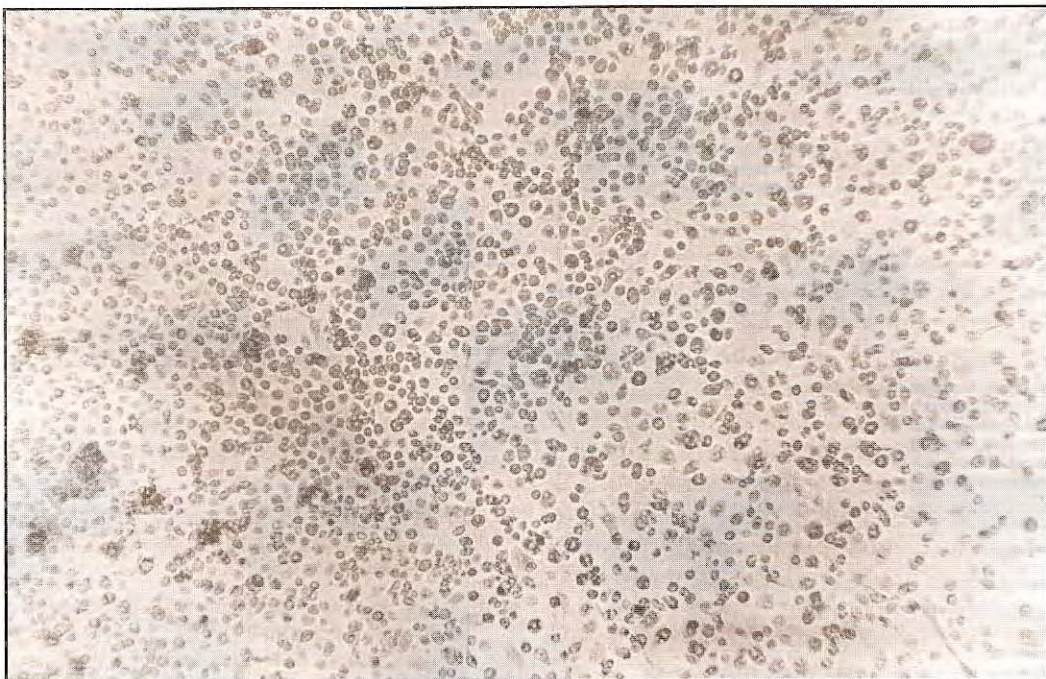


**Figura 4.** Ovarios suspendidos en el medio de crecimiento MM/VP12 en ausencia de proliferación celular periférica, 40X





**Figura 5.** Monocapa constituida por una morfología celular heterogénea derivada de tejidos embrionarios, 200X



**Figura 6.** Monocapa confluyente con células de formas epiteloides derivada de fragmentos larvales, 40X



que impulsaran el crecimiento. El establecimiento de líneas celulares de mosquitos en otras especies, a partir de tejidos ováricos (18,29), demostró, en contraste con los resultados obtenidos en el presente trabajo, una mayor efectividad para dar inicio al crecimiento celular en los cultivos primarios y consecuentemente el tiempo empleado en la formación de colonias alrededor de los ovarios fue más corto, lo cual indica que, muy probablemente, factores nutricionales determinantes para una eficaz proliferación celular están ausentes en los medios de cultivos utilizados.

Las formas de las células en las etapas iniciales del crecimiento fueron variadas, tal como ocurre frecuentemente en cultivos mixtos, cuyas células provienen de tejidos embrionarios y larvales con diferentes especializaciones; sin embargo, en la medida en que las células proliferaron y alcanzaron mayor espacio en la superficie del frasco, éstas tomaron mayoritariamente formas epitelioides, siendo aún más evidentes en la monocapa; algo similar se informa sobre otros cultivos celulares de mosquitos (10,13), en los que existieron definidas formas epitelioides o fibroblástoides al llenarse la monocapa. Los tamaños celulares de los cultivos primarios de *Ps. confinnis* fueron relativamente mayores comparados con los obtenidos en otras especies de mosquitos (9,11,28).

A pesar de emplearse en el presente trabajo diversos medios de cultivos bajo las mismas condiciones, el crecimiento celular se produjo sólo en los frascos con el medio MM/VP12, lo cual indica que éste aportó las sustancias nutritivas necesarias y suficientes para que las células pudieran adaptarse y proliferar hasta constituir la monocapa; sin embargo, sólo se pudieron desarrollar dos pases sucesivos, debido a que las células fueron perdiendo viabilidad entre uno y otro replique, hasta que finalmente en otro intento por volver a subcultivarse no respondieron. Esta situación permite inferir que la capacidad de adaptación y crecimiento de las células en los cultivos secundarios fue diferente a las establecidas en los explantes y en las etapas iniciales de la proliferación celular, por lo que es necesario modificar algunas condiciones

nutritivas, físicas o ambientales para lograr la continuidad de los cultivos a través de diversos pases, con miras a lograr la línea celular; también en algunos frascos este problema se relaciona con un deterioro estructural y funcional de las células, probablemente debido a microorganismos y/o parásitos de origen transovárico, los cuales logran en los cultivos niveles altos de reproducción hasta la destrucción de las células.

### Agradecimientos

Al señor Jesús Escovar, auxiliar del Laboratorio de Investigaciones de Entomología de la Universidad de La Salle por el suministro del material biológico.

A Colciencias (Proyecto 1243-05-278-97), Universidad De La Salle e Instituto Nacional de Salud por la financiación del presente trabajo.

### Referencias

1. **PAHO-Panamerican Sanitary Bureau.** Venezuelan Encephalitis. Scientific Publication. No. 243. Washington D.C.; 1972. p. 157-61.
2. **Forattini OP.** Entomología Médica. Vol. 2. Universidad de Sao Paulo. Sao Paulo, Brasil.; 1965. p. 422-8.
3. **Olanov VA, Morales A.** Colonización de una cepa de *Psorophora* (*Grabhamia*) *confinnis* Arribalza, 1891, en Colombia. *Biomédica* 1981;1:12-5.
4. **González C.** Mosquitos de Caño Limón, Arauca (Diptera: Culicidae). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Tesis de Grado. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia; 1995. p. 150-3.
5. **GraceTDC.** Establishment of a cell line of mosquito (*Aedes aegypti*) cells grown in vitro. *Nature* (London) 1966;211:366-7.
6. **Peleg J.** Growth of arboviruses in primary tissue culture of *Aedes aegypti* embryos. *Am J Trop Med Hyg* 1968;17:219-23.
7. **Bhat U, Singh K.** Structure and development of vesicles in larval tissue culture of *Aedes aegypti* (L.). *J Med Entomol* 1969;6:71-2.
8. **Varma M, Pudney M.** The growth and serial passage of a cell line from *Aedes aegypti* (L.) larvae in different media. *J Med Entomol* 1969;6:432-9.
9. **Cahoon BE, Hardy JL, ReevesWC.** Initiation and characterization of a diploid cell line from larval tissues of *Aedes dorsalis* (Meigen). *In vitro cell* 1978;54:255-60.
10. **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.



11. **Rowley WA, Dorsey DC, Knowless 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.
12. **Oelofsen MJ, Gericke A, Smith MS, Van Der Linde TC.** Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex (Culex) theileri* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infection with arboviruses. *J Med Entomol* 1990;27: 939-44.
13. **Pant U, Sudeep AB, Dhanda V, Mourya DT, Banerjee K.** New embryonic cell line from *Aedes krombeini* (H.) (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell Dev Biol* 1992;28A:567-8.
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 Do Inst Oswaldo Cruz* 1995;90:547-51.
15. **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 Do Inst Oswaldo Cruz* 1997;92:123-8.
16. **Hink WF.** The 1979 compilation of invertebrate cell lines and culture media. *Systems in vitro* 1980. p. 553-84.
17. **Mitsubishi J.** Establishment and some characteristics of a continuous cell line derived from fat body of the *Cabbage armyworm* (Lepidoptera: Noctuidae). *Dev Growth Differ* 1981;23:63-72.
18. **Hsu SH, Li SY, Cross JH.** A cell line derived from ovarian tissue of *Culex tritaeniorhynchus summorosus* Dyar. *J Med Entomol* 1972;9:86-91.
19. **Grace TDC.** Development of insect cell culture. "In invertebrate cell culture, application" (K. Maramorosch and J. Matsubishi, Eds). New York: Academic Press; 1982. p. 1-8.
20. **Igarashi AI.** Mosquito cell cultures and the study of Arthropod-borne togaviruses. *Adv Virus Res* 1985;30:2142.
21. **Kuno G, Gubler DJ, Velez M, Oliver A.** Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ* 1985;63:279-86.
22. **Lee SH, Hou RF.** Establishment of a cell line derived from embryos of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *J Invert Pathol* 1992;59:174-7.
23. **Maramorosch K.** "Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture". San Diego: Academic Press. 1987. p.511.
24. **Sieburth PJ, Manuriak JE.** Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *In vitro cell* 1988;24:195-8.
25. **Alarcón J, Olano V, Morales A, Rodríguez J, Bello F.** Colonización de *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae), cepa Loricá- Córdoba, Colombia. *Diógenes. Revista de Investigación en Ciencias y Enseñanza de las Ciencias* 1999;5:181-91.
26. **Mitsubishi J, Maramorosch K.** Leafhopper tissue culture: embryonic nymphal and imaginal tissue from aseptic insects. *Contrib Boyce Thompson Inst* 1964;22:435-60.
27. **Kitamura S.** Establishment of a cell line from *Culex* mosquito. *Kobe J Med Sci* 1970;16:41-50.
28. **Varma MRG, Pudney M.** *Anopheles stephensi* var. *mysorensis*: establishment of a larval cell line (Mosq. 43) *Exp Parasitol* 1971;29:7-12.
29. **Hsu SH, Mao H, Croos HJ.** Establishment of a line of cells derived from ovarian tissue of *Culex quinquefasciatus* Say. *J Med Ent* 1970;7:703-7.
30. **Marhoul Z, Pudney M.** A mosquito cell line (Mos. 55) from *Anopheles gambiae* larva. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972;66:183-4.