

NUEVO METODO PARA EL ESTUDIO DE CROMOSOMAS EN INSECTOS (*)

P O R

GUIDO CEA CIFUENTES (**)

R E S U M E N

Se presenta una técnica directa nueva para el estudio de cromosomas meióticos, a partir de células gonádica de insectos suspendidas en medios apropiados.

A B S T R A C T

A new direct technique for the study of meiotic chromosomes in insect gonad cells suspended in adequate media is presented.

Desde que Nakino, S. y Nishimura, I. (1) y Hughes (2) en 1952 introdujeron los métodos de pretratamiento con medios hipotónicos y Hsu, T. C. y Pomerat, C. M. (3) en 1953 los perfeccionaron, se ha generalizado su uso para esparcir e hinchar las células con el objeto de obtener cromosomas en condiciones de ser observables analíticamente. Moorhead, P. S. et Al. (4) en 1960, informaron sobre un método indirecto para la observación de cromosomas de leucocitos cultivados, utilizando sangre periférica en mamíferos, en que hace uso de pretratamiento hipotónicos finos y entrega una pauta general de procedimiento para trabajar con células suspendidas que ha sido aplicada a otros tejidos cuyas células tienen capa-

divisiva. Numerosas han sido las modificaciones efectuadas a esta técnica y los tejidos utilizados, sin embargo para gónadas de insecto no había sido desarrollada una técnica similar, que permitiera la obtención simultánea, de un número relativamente alto de preparados, conteniendo placas con características óptimas para un estudio citológico fino.

El método directo que se presenta en este trabajo se está utilizando con éxito en forma rutinaria en nuestro laboratorio, especialmente en el estudio citogenético de Orthoptera, obteniéndose rápidamente por medio de él, gran cantidad de células grandes, según el estadio del ciclo divisiva en que se encuentren los

(*) Financiado con fondos del proyecto N° 2.08.01 del Consejo de Investigación Científica de la Universidad de Concepción.

(**) Prof. Lic. Guido Cea Cifuentes. Departamento de Biología Celular. U. de Concepción, Chile.

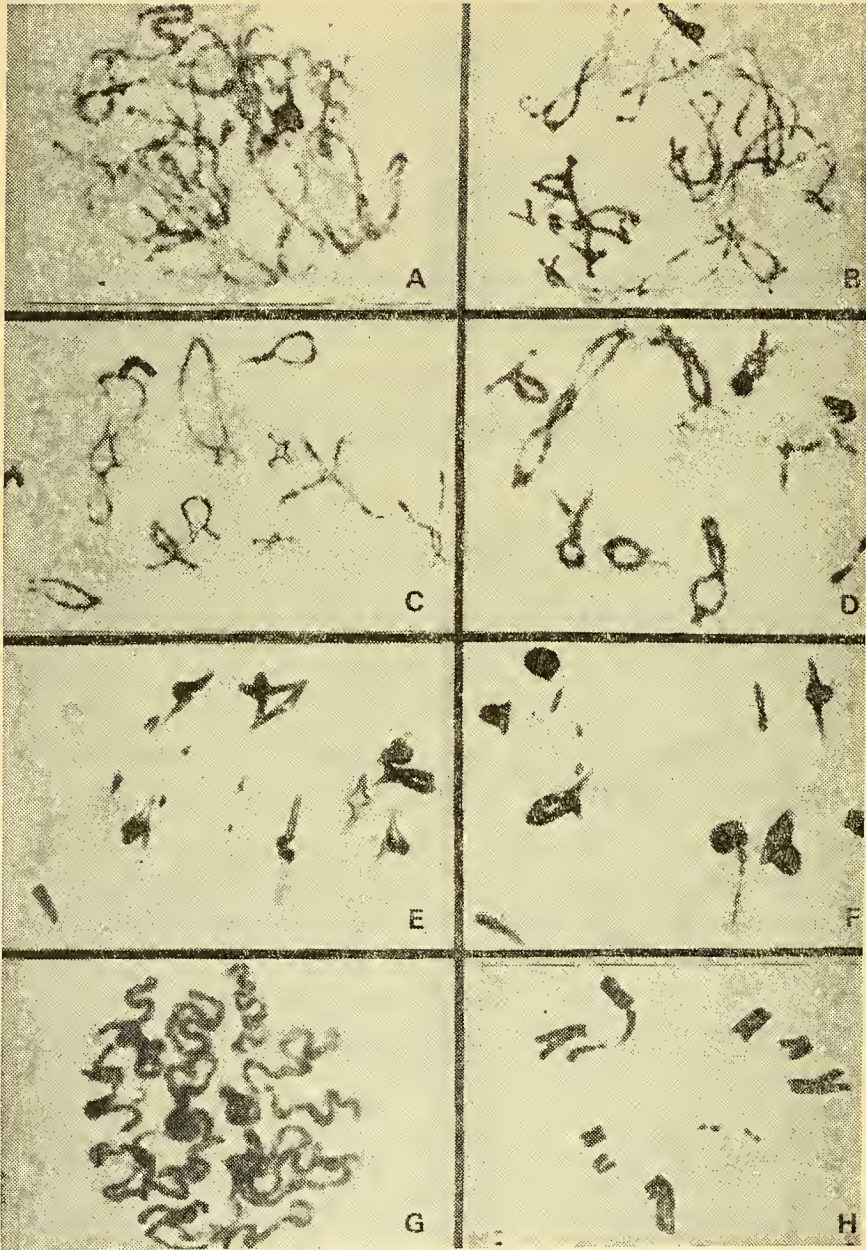


Fig. 1.—Estadios de la meiosis en células gonádicas del macho de *Aucacris eumera* Hebard (Orthoptera, Acrididae, Omexechinae). A.—Paquiteno. B.—Diploteno medio. C.—Diploteno final. D.—Diacinesis. E-F.—Metafase I. G.—Profase II. H.—Metafase II.

cistos gonádicos, bien fijadas y que contienen cromosomas separados y fácilmente individualizables para un análisis microfotográfico. Una desventaja de este método, con respecto al clásico procedimiento de aplastado celular, es el que al separarse las células de los cistos gonádicos, que son sincrónicos en su proceso divisional, éstas no aparecen en forma de "nidos" o agrupaciones celulares en el mismo estado del ciclo meiótico.

DESCRIPCION DE LA TECNICA:

- 1.— Se efectúa rápidamente la disección del insecto extrayendo las gónadas mediante pinzas, las cuales se llevan a un tubo de centrifuga que contiene una solución de citrato de sodio al 0.8%.
- 2.— Se disgrega el tejido mecánicamente con una jeringa o micropipeta hasta obtener una suspensión homogénea de células. Cuando la cantidad de material es pequeña es recomendable siliconar el material de vidrio que se utiliza. La operación de disgregación celular no debe exceder los 10'.
- 3.— Se centrifuga durante 5' a 800 r.p.m. Se elimina el sobrenadante. Así se completa un tiempo máximo en solución hipotónica de citrato de sodio al 0.8% de 15'.
- 4.— Se fija el botón celular con una mezcla de tres partes de etanol y una parte de ácido acético glacial. Los reactivos deben ser proanálisis. El fijador se prepara al momento de usar y debe agregarse con mucho cuidado por las paredes del tubo a objeto de no destruir el botón celular.
- 5.— Se tapa el tubo de centrifuga con parafilm y se guarda a 4°C cambiando el fijador una vez a los 20'. Se repite la operación a los siguientes 20'. Se puede guardar por 24 hrs. o continuar inmediatamente con los pasos siguientes.
- 6.— Se prepara una solución de ácido acético al 45%.
- 7.— Se extrae el sobrenadante del tubo sin remover el botón celular. Se agrega ácido acético al 45% con una micropipeta, dejando resbalar el lí-

quido suavemente por las paredes del tubo. La cantidad de ácido acético que se agrega depende del tamaño del botón celular.

- 8.— Resuspender suavemente. Se dejan decantar los trozos más grandes.
- 9.— Por el método usual de goteo se esparcen las células suspendidas sobre portaobjetos desgrasados y mantenidos a 45°C. Se deja evaporar el ácido acético.
- 10.— Optativamente se puede efectuar una hidrólisis ácida previa a la tinción durante 8' a 60°C.
- 11.— Se tiñen las placas con Bacto-Giemsa Stain según Difco, durante 20'. El colorante se prepara diluyendo 1 ml de Bacto-Giemsa Stain en 17 ml de agua bidestilada.

Se puede usar cualquier otro procedimiento de tinción en reemplazo del Giemsa.

- 12.— Se lavan los portaobjetos en agua bidestilada y se secan rápidamente al aire.
- 13.— El montaje se efectúa por los métodos usuales.

Se presentan a continuación una serie de microfotografías (Fig. 1) obtenidas de preparados efectuados por el método descrito utilizando gónadas de *Aucacris eumera* Hebard (Orthoptera, Acrididae Ommexechinae, Aucacriní) ♂ 2n = 22 + XO. Se utilizó para ello película Agfa 12 Din.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.— Makino, S.E. e I.N. Nishimura. Water pretreatment Squash technic. Stain Tech, 27:1. 1952.
- 2.— Hughes, A. Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures. Quart J. Microscop. Sci. 93:207. 1952.
- 3.— Hsu, T.C. y C.M. Pomerat. Mammalian chromosomes in vitro. I. A methods for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. J. Heredity 44:23. 1953.
- 4.— Moorhead, P.S., P.C. Nowell; W.J. Mellman; D.M. Battips y D.A. Hungerford. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res., 20: 613. 1960.