

70
Le. S



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de
Aedes aegypti como posibles bloqueadores a la infección
por el virus Dengue serotipo 2 en células C6/36
provenientes de *Aedes albopictus*

T E S I S
Que para obtener el Título de
B I O L O G O
p r e s e n t a

Luis Manuel Gutiérrez Galindo



1995

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
REGION ESCOLAR

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

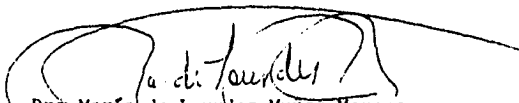
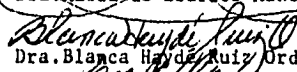
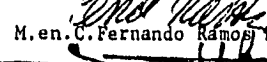


Anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de Aedes aegypti
como posibles bloqueadores a la infección por el virus dengue serotipo 2
en células C6/36 provenientes de Aedes albopictus .

realizado por Luis Manuel Gutiérrez Galindo.

con número de cuenta 8827826-9 , pasante de la carrera de biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis	 Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno.
Propietario	
Propietario	 Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordáz.
Propietario	 M. en. C. Fernando Ramos Reyes.
Suplente	 M. en. C. Sergio Ibanes Bernal.
Suplente	 F.F.S. Rodríguez

COORDINACIÓN GENERAL DE CIENCIAS



Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Doctora María de Lourdes Muñoz Moreno.

**A MIS PADRES MAXIMINO GUTIERREZ ZAMORA
Y VICTORINA GALINDO MEDINA POR HABERME
CONCEDIDO, CRIADO Y FORMADO DE BUENA MANERA.**

**A MIS HERMANOS
MIGUEL ANGEL Y CLAUDIA PATRICIA
POR APOYARME EN TODO MOMENTO.**

**DE MANERA MUY ESPECIAL
A MI HERMANA CLAUDIA PATRICIA
POR LA ANECDÓTICA SITUACIÓN
RECIENTE ACONTECIDA EN LA FAMILIA.**

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra Lourdes Muñoz por haberme dado la oportunidad de realizar el trabajo en el laboratorio a su cargo y por la ayuda brindada durante el tiempo que ocupó el desarrollo de la tesis.

A Rosalinda Tovar por la conducción inicial en el trabajo experimental y por la disposición mostrada hacia mi trabajo en el laboratorio.

A las personas que colaboraron conmigo directa o indirectamente al inicio del proyecto: Jorge Ayala, Elena, Maria Eugenia y Ana.

A los compañeros del laboratorio que interactuaron más directamente en la realización de las actividades experimentales: Rosalinda Tovar, Jorge Cruz, Elizabeth Cordoba, Saúl Ramírez, Gloria León y Alejandro Cisneros.

A todos los integrantes del laboratorio 1: Gloria, Saúl, Elizabeth, Carlitos, Omar, Angélica, Jorge, Victor, Alejandro, Miguel, Hugo, Hebert, Isabel, Norma, Francisco, Moisés, Gerardo, Eduardo, Rosa María, Margarita, Rosalinda, Adrián, Jose Luis, Lidia, Javier, Carlos Hoyo, Carlos Cerpa y Pradeep Das.

A mi comite tutorial por las revisiones hechas al trabajo y el tiempo aportado para esta tarea: Dra Blanca Ruiz, Q.F.B Rosa Elena Sarmiento, M.en.C Fernando Ramos y al M.en.C Sergio Ibañez.

A la unidad de microscopía del CINVESTAV por la ayuda técnica en el trabajo experimental.

INDICE

I.-RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	2
1.- La enfermedad y el virus del dengue	2
2.- La familia flaviviridae y el virus dengue	5
3.- El ciclo de transmisión y el vector	11
4.- Control inmunológico de vectores	15
III.- OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	18
IV.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
V.- MATERIALES Y METODOS	20
1.- Cuantificación de proteínas	20
2.- Cultivo celular de la clona C6/36 proveniente de <i>Ae. albopictus</i>	21
3.- Electroforesis de proteínas	22
4.- Inmunización de ratones BALB-C y C57BL/6 con porciones de intestino medio de <i>Ae. aegypti</i>	24
5.- Extracción de proteínas del intestino medio de <i>Ae. aegypti</i>	28
6.- Pruebas de ELISA indirecta con los anticuerpos de ratón anti-intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> usando como antígeno extractos de células C6/36	28

7.-Inmunolectrotransferencia de extractos de células
 C6/36 usando anticuerpos anti-intestino medio
 de *Ae. aegypti*29

8.- Reconocimiento de células C6/36 por
 inmunofluorescencia indirecta mediante anticuerpos
 de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*30

9.- Biotinilación del virus dengue.....31

10.- Ensayo de unión del virus del dengue
 serotipo 2 en proteínas de células C6/36
 electrotransferidas en papeles de nitrocelulosa.....31

VI.- RESULTADOS.....33

1.- Especificidad de anticuerpos policlonales
 de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti* en
 extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus*
 y de Intestino medio de *Ae. aegypti* por ELISA indirecta.....33

2.- Identificación de polipéptidos de extractos
 de células C6/36 por inmunolectrotransferencia
 con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino
 medio de *Ae. aegypti*.....42

3.- Reconocimiento de antígenos de mosquito en células C6/36
 mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-intestino
 medio de *Ae. aegypti*.....50

4.- Ensayo de unión del virus dengue serotipo 2
con proteínas de células C6/36..... 61

VII.- DISCUSION..... 66

VIII.- CONCLUSIONES..... 72

IX.- BIBLIOGRAFIA..... 74

LISTA DE TABLAS.

1.- Protocolo de inmunización con porciones de
intestino medio de *Ae. aegypti* en ratones BALB-C..... 25

2.- Protocolo de inmunización con porciones de
intestino medio de *Ae. aegypti* en ratones C57BL/6..... 26

3.- Evaluación inmunoquímica de anticuerpos de
ratón (BALB-C) anti-intestino medio de
Ae. aegypti en células C6/36..... 63

4.- Evaluación inmunoquímica de anticuerpos de
ratón (C57BL/6) anti-intestino medio de
Ae. aegypti en células C6/36..... 64

LISTA DE FIGURAS.

1.- Estrategia de inmunización de ratones de las cepas BALB-C y C57BL/6 con porciones de intestino medio de <i>Ae. aegypti</i>	24
2.- Preparaciones de extractos de células C6/36 fraccionadas por electroforesis de proteínas en geles teñidos con azul de Coomassie.....	44
3-7.-Inmunoelctrotransferencia de extractos de células C6/36 de <i>Ae. albopictus</i> con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de <i>Ae. aegypti</i>	45
8.-Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón inmunizado con adjuvante.....	51
9, 10 y 11.-Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón BALB-C inmunizado con 100 µg de intestino medio de <i>Ae.aegypti</i>	52
12 y 13.-Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón C57BL/6 inmunizado con 25 µg de intestino medio de <i>Ae.aegypti</i>	55
14.-Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón C57BL/6 Inmunizado con 50 µg de intestino medio de <i>Ae.aegypti</i>	57
15 y 16.-Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón C57BL/6 inmunizado con 100 µg de intestino medio de <i>Ae.aegypti</i>	58

17.-Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 no permeabilizadas empleando una mezcla de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de <i>Ae.aegypti</i>	60
18.- Ensayo de unión del virus dengue serotipo 2 en proteínas de células C6/36 electrotransferidas en membranas de nitrocelulosa.....	62

LISTA DE GRAFICAS.

Gráfica 1: ELISA indirecta en células C6/36 provenientes de <i>Ae. albopictus</i> de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> . Los ratones BALB-C fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> . En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.....	34
--	----

Gráfica 2: ELISA indirecta en células C6/36 provenientes de <i>Ae. albopictus</i> de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> . Los ratones BALB-C fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> . En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.....	35
--	----

Gráfica 3: ELISA indirecta en células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones BALB-C fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.....36

Gráfica 4: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 25 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.....37

Gráfica 5: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 50 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.....38

Gráfica 6: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 50 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.....39

Gráfica 7: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón_____40

Gráfica 8: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón_____41

RESUMEN

Se mostró que anticuerpos policlonales de ratones anti-intestino medio de *Ae.aegypti* reconocieron antígenos de células cultivadas de *Ae.albopictus* denominadas C6/36 las cuales son permisivas a la infección con el virus del dengue serotipo 2.

El reconocimiento fué evaluado mediante técnicas inmunoquímicas tales como ELISA indirecta, Inmunofluoresencia indirecta, Inmunolectrotransferencia sobre extractos de células C6/36 lo que mostró que se presenta **reactividad cruzada** de los anticuerpos anti-intestino medio de *Ae.aegypti* con células larvales de *Ae.albopictus*.

Usando antígeno de extracto total de células C6/36 la reactividad obtenida por ELISA mostró títulos de 1:1000 a 1:64,000 y reconoció péptidos de 13 a 233 kDa por inmunolectrotransferencia. Mediante ensayos de inmunofluoresencia en células se observó que los anticuerpos reconocieron proteínas de membrana, citoplasma y en algunos casos toda la célula dependiendo del anticuerpo empleado.

En experimentos de union *in vitro* del virus dengue serotipo 2 con extractos de células C6/36 se mostró la interacción con moléculas de masa molecular aproximada de 165, 116, 83, 70, 63, 54, 30 y 13 kDa.

De 47 antisueros positivos, 15 reconocieron polipéptidos cercanos con pesos moleculares aparentes de 29, 13, 71, 31 y 162 kDa similares a las moléculas que interactúan con el virus. Todos los anticuerpos reconocieron proteínas membranales de células en cultivo.

Se tiene la hipótesis de que la entrada del virus dengue durante la infección en la célula hospedera depende de la unión a sus receptores celulares y los anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Aedes aegypti* podrían ser utilizados como posibles bloqueadores a la infección por el virus del Dengue serotipo 2 en células C6/36 originadas de larvas de *Aedes albopictus*.

INTRODUCCION.

La Enfermedad y el virus del Dengue.

El dengue es una enfermedad febril aguda provocada por la infección del virus del mismo nombre que se manifiesta por presentar cuadros febriles o fiebres hemorrágicas y que es transmitido de un humano virémico a otro sano mediante la picadura de vectores artrópodos hematófagos, principalmente mosquitos del género *Aedes*; los principales vectores son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en zonas endémicas tropicales, subtropicales y urbanas del este y oeste de Africa, el Mediterráneo, la India, Sri Lanka, el sureste asiático, una buena parte de las islas del Pacífico, Oceanía y en el continente americano principalmente en el Caribe, Sudamérica, Centroamérica y México además de algunas partes de los Estados Unidos (1, 2, 3).

La tasa de infección anual en el mundo es de alrededor de 100 millones de personas y la cantidad de gente que potencialmente está expuesta a la infección es de 1,500 millones aproximadamente. En Latinoamérica entre los años de 1980 a 1990 se registraron 1,006,702 casos del padecimiento en donde el 30% correspondió a Sudamérica, el 48% a Centroamérica, 43% al Caribe y el 22% a México (1).

En México los primeros casos diagnosticados de dengue se registraron en 1978 en Tapachula, Chiapas. Así, entre los años de 1980 a 1990, se registraron 227,229 casos localizados en su mayoría en 13 estados de la república (Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Puebla y Michoacán), actualmente prácticamente en todas las entidades federativas existen casos diagnosticados de dengue (1).

La tasa de incidencia durante este periodo ha descendido a partir de 1980 pero presenta discretos aumentos afectando principalmente a la población de adultos jóvenes. Por lo tanto la enfermedad del dengue en México se presenta como un problema de salud pública de relevancia epidemiológica con una alta morbilidad y baja mortalidad.

Existen cuatro serotipos del virus (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4) que tienen un papel importante en la infección, patología y sus manifestaciones clínicas. La expresión clínica de la enfermedad es mas frecuente en niños y produce un espectro clínico muy amplio que va desde infecciones asintomáticas que presentan un cuadro febril después de 2 a 7 días de

incubación. La infección confiere inmunidad permanente hacia un solo serotipo (homotípica) y una inmunidad cruzada (heterotípica) a cualquier otro serotipo por algunas semanas (4).

Se presentan dos formas clínicas de la enfermedad: el dengue clásico ó fiebre del dengue y fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque del dengue (FHD/SChD).

El dengue clásico se presenta principalmente en adultos jóvenes con un cuadro febril de más de dos días de duración acompañado de dolor retrocular, de espalda, muscular, de articulaciones y conjuntivitis. Se pueden presentar náuseas y vómitos, linfadenopatía, parestésis cutáneas, edema palmar, cambios en el gusto, anorexia, constipación y depresión; las petequias son poco abundantes.

La FHD/SChD por su carácter altamente endémico, se ha sugerido que se debe a una respuesta inmune secundaria a un serotipo distinto (principalmente el serotipo 2) provocada por una segunda infección y en algunos casos en infecciones primarias (1, 4).

La mayor parte de las manifestaciones clínicas suceden en individuos menores de 15 años con una altísima incidencia en bebés de más de un año. Los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) para la FHD/SChD incluyen cuatro grados de la enfermedad con diferentes signos y síntomas.

Las manifestaciones de la FHD/SChD son tales como petequias, equimosis, hematemesis, melena, leucopenia, sangrado genital, trombocitopenia, fiebre, cefalea, mialgias, diaforesis, acrocianosis, hiperventilación, irritabilidad e inquietud.

Según los criterios de la O.M.S la FHD/SChD se establece en el momento en que se detecta hipotensión. Los dos últimos grados de la FHD/SChD son los más severos y pueden conducir a la muerte, presentándose síntomas como hipotensión, pulso débil, falla circulatoria, choque profundo, tensión arterial y finalmente ausencia de pulso (5).

En los últimos veinte años la FHD/SChD en forma epidémica se ha incrementado notablemente en nuevas áreas de alta incidencia; así, cerca de 250, 000 casos de Dengue Hemorrágico son anualmente reportados. En América la primera incidencia de esta forma de la enfermedad apareció en Cuba en 1981 con 10,000 pacientes afectados.

En estos momentos el problema de la FHD/SChD representa una amenaza a la salud pública del continente americano debido a: la extensión de zonas endémicas e hiperendémicas, la dinámica poblacional de diferentes vectores (*Ae. albopictus*), la distribución de los diferentes serotipos del Dengue en cada una de las regiones afectadas y la variación en la virulencia de diferentes cepas en lugares localizados (2).

El virus del Dengue es un miembro de la familia Flaviviridae la cual comprende un conjunto de virus relacionados morfológica, genética y bioquímicamente, siendo un grupo de gran importancia médica (3,6).

La patogénesis de los flavivirus reside principalmente en tres patrones bien reconocidos de infecciones: cuadros febriles sistémicos (infecciones pantomórficas), fiebres hemorrágicas (infecciones visceromórficas) y encefalitis (infecciones neuromórficas). El virus dengue produce infecciones pantomórficas, visceromórficas como la manifestación clínica más severa así como también infecciones neuromórficas observándose en algunos casos con ciertas alteraciones neurológicas no usuales en humanos (7), pero principalmente en infecciones del sistema nervioso central de ratones neonatos.

La FHD/SChD es un proceso patológico complejo en cuanto a su tropismo (tejidos, órganos y células blanco) y los mecanismos inmunológicos que intervienen en la infección.

La patología de la FHD/SChD en un análisis macroscópico se manifiesta como alteraciones de órganos como el hígado, médula ósea, órganos linfoides, corazón, pulmón y riñón; los daños en médula ósea repercuten en otros órganos como en las áreas dependientes de linfocitos T (Timo, nódulos linfáticos y el bazo) donde se aprecia linfocitosis, fagocitosis de linfocitos e hiperplasia de células reticulares y células plasmáticas (8, 9, 10).

Las células blanco para la infección del virus dengue en hospederos vertebrados son principalmente los fagocitos de la línea mononuclear o monocitos (macrófagos) donde la duplicación viral sucede en el citoplasma (4, 11).

Los mecanismos inmunológicos que actúan durante la infección viral relacionados a la FHD/SChD son poco entendidos, no obstante, por estudios *in vitro* se plantea la hipótesis de (establecida con estudios en monocitos cultivados utilizando concentraciones subneutralizantes de antisueros contra el dengue) que la formación de complejos virus-anticuerpo provocan un incremento de la infección viral, fenómeno conocido como facilitación de la infección mediada por anticuerpos heterotípicos no neutralizantes (ADA).

Este fenómeno se cree que sucede debido a las infecciones secundarias con un serotipo viral diferente donde las inmunoglobulinas (Igs) subneutralizantes (anticuerpos heterotípicos contra el Dengue) forman el complejo anticuerpo-virus que se une al receptor Fc localizado en la superficie celular de monocitos/macrófagos; este complejo aumenta la adhesión y penetración viral en la célula extendiendo rápidamente la infección y dando como resultado la producción en altos títulos del virus(4).

Este fenómeno ha sido observado en otros flavivirus incluyendo los cuatro serotipos del Dengue, así como en otros grupos de familias virales

como los Alfatogavirus, Poxvirus, Bunyavirus, Rhabdovirus, Coronavirus, Herpesvirus y Reovirus (4). En resumen, se cree que el ADA es una vía que facilita la penetración del virus en las células blanco de vertebrados tales como el macrófago.

Los signos de la FHD/SChD que incluyen un aumento en la permeabilidad vascular, la activación de complemento, el consumo de fibrinógeno y la eliminación de los virus están relacionados con las células T citotóxicas cuyos mecanismos son inducidos por la activación de los monocitos/macrófagos infectados (8).

Los mecanismos de reactividad cruzada de las células T (células CD4+ y CD8+ citotóxicas) dirigidos contra antígenos de las partículas virales (proteínas no estructurales) localizados en el interior de los monocitos incluyen: liberación de enzimas que activan el sistema de complemento, tromboplastina y factores de permeabilidad celular (citocinas), que conducen a una cascada de eventos que amplifican y regulan los fenómenos patofisiológicos como la falla en la circulación, hipotensión y coagulación anormal (8).

La Familia Flaviviridae y el virus Dengue.

El virus dengue es un flavivirus y forma parte de una familia viral reconocida en 1984 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV). El aspecto histórico del surgimiento de esta familia es reciente y se ubica en los siguientes hechos (12).

Las enfermedades virales transmitidas por artrópodos succionadores de sangre comenzó con los estudios sobre la fiebre amarilla a cargo del médico cubano Carlos J. Finlay en 1881, posteriormente en 1902 Reed y Carrol de la Comisión de la Fiebre Amarilla del Ejército de los Estados Unidos en Cuba establecieron formalmente que el virus de la fiebre amarilla es transmitido por el mosquito *Aedes aegypti*.

A partir de estos estudios preliminares y con subsecuentes aislamientos en el campo de otros virus en artrópodos se acuñó inicialmente el término de "arbovirus" (1945), posteriormente se acordó en "arbovirus" (contracción de la palabra en inglés "arthropod-borne viruses", i.e. virus originado en artrópodos) en 1957.

De esta manera los arbovirus se agruparon en base a análisis serológicos en dos grupos denominados : Grupo A (Alfavirus) y Grupo B (Flavivirus) que conjuntamente se denominaban **Togavirus** por poseer en su estructura una envoltura de bicapa lipídica. Esto último sucedió cuando en la reunión del Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (CINV) en Moscú

en 1966 se designó un Subcomite de Virus de Vertebrados el cual creó el Grupo de Estudio de Arbovirus encabezado por el Dr Casals. Así, cuando el CINV se reunió en la Ciudad de México en 1970, el Grupo de Estudio de Arbovirus acuñó el término Togavirus para agrupar a los grupos A y B de arbovirus.

Finalmente en 1984 el Grupo de Estudio en Togavirus propuso la separación de los flavivirus de la familia debido a diferencias en cuanto a las estrategias de duplicación y la producción de proteínas estructurales entre otros; la propuesta fue aceptada por CITV ese mismo año creandose la familia **Flaviviridae**.

De esta manera, la definición de arbovirus establecido por la O.M.S. en 1985 es :

"Los virus mantenidos principalmente por medio de picaduras de artrópodos hematófagos en hospederos vertebrados susceptibles donde se multiplican y producen viremia (transmisión biológica horizontal) ó por medio de la transmisión transovárica y posiblemente venerea en artrópodos (transmisión vertical); el tiempo necesario para la multiplicación del virus en los tejidos del artrópodo se denomina periodo de incubación extrínseco," (13, 14).

Los arbovirus se clasifican en un conjunto de familias y géneros donde algunas(os) satisfacen la definición anterior como por ejemplo, los géneros *Orbivirus* y *Coltivirus* de la familia Reoviridae, las familias Flaviviridae y Alfatoxaviridae y finalmente los géneros *Bunyamwera*, *Phlebo* y *Nairovirus* de la familia Bunyaviridae. Otros a diferencia son específicos de insectos (Nodaviridae), y los de posición incierta como la familia Rhabdoviridae.

Además los arbovirus presentan un intervalo de hospederos (vertebrados, invertebrados y plantas), material genético (DNA o RNA de hebra sencilla o doble), sentido de transcripción (RNA+ ó RNA- de hebra sencilla) y la presencia o no de envoltura, (3, 14, 6).

La familia Flaviviridae contiene al menos 68 virus que tienen una estructura de duplicación, morfología y características genéticas similares consistiendo de partículas esféricas con un diámetro de 40 a 60 nm con envoltura de bicapa lipídica que tienen una molécula de RNA de cadena sencilla con sentido positivo infeccioso (3, 6).

Los miembros de la familia son biológicamente parecidos aunque consisten en una amplia variedad de virus con patología y ecología distintas.

Entre ellos los más notables por sus manifestaciones son los virus de la fiebre amarilla, dengue y encefalitis japonesa. Los ciclos de transmisión son ecológicamente complejos e incluyen además de los humanos a reservorios de fauna silvestre junto con vectores tales como los mosquitos y garrapatas (3).

Los flavivirus se clasifican por medio de patrones serológicos cuantitativos en complejos antigénicos basados en pruebas de reactividad cruzada de neutralización con sueros policlonales de ratón.

Los determinantes antigénicos responsables para su clasificación se encuentran en los dominios de la glucoproteína E. Se reconocen ocho grupos o complejos antigénicos en donde en algunos se encuentran a virus responsables de muchas enfermedades tales como: Encefalitis originada por garrapatas (encefalitis central europea, Omsk, fiebre hemorrágica, Neigishi, Powassan, etc); Rio Bravo (Rio Bravo, Bukalasa, Saboya, Apoi, etc); Encefalitis japonesa (encefalitis japonesa, encefalitis del Valle de Murray, el virus del Oeste del Nilo, Koutango, etc); Tyuleny (Tyuleny, el filón de Saumarez y Meaban); Ntaya (Ntaya, meningoencefalitis turca de Israel, Bagaza, etc); Uganda S (Uganda S, Banzi, Bouboui, etc); Dengue (Den1, Den2, Den3 y Den4); Modoc (Modoc, Salvieja, Juitiapa, San Perlita, etc) y finalmente un grupo no asignado donde encontramos a la fiebre amarilla además de otros (3).

El RNA de los flavivirus tiene una longitud aproximada de 11 kb que codifica para las proteínas responsables de la duplicación viral, el RNA viral es una molécula de RNAm específicos del virus con una estructura CAP tipo I (m7GpppAmp) en el extremo 5'-terminal. El RNA viral carece generalmente de la estructura 3'-terminal típica de residuos de adenina metilados. Después de la estructura CAP existe una secuencia de dinucleótidos conservados AG. El RNA además sirve como molde para la producción de RNA viral complementario (vcRNA) y que sucesivamente sirve como templado para la producción de RNA viral con sentido de transcripción positivo (6).

La característica más notable del genoma flaviviral es que tiene un sólo marco de lectura abierto (ORF) de alrededor de 10 Kb el cual codifica para una poliproteína de 3,386 a 3,434 aminoácidos; flanqueando en dos extremos del ORF hay secuencias no codificantes con una longitud de 95 a 132 bases (6).

La traducción del RNA monocistrónico deriva en la producción de proteínas estructurales y no estructurales en el siguiente orden de síntesis proteica 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', la poliproteína viral resultante es madurada por un procesamiento postraduccional proteolítico en sitios específicos del segmento lo cual sucede en el lumen del retículo endoplásmico rugoso y el citoplasma de la célula hospedera.

La partícula viral consiste de una parte central que contiene la proteína C de 13 a 14 kDa y la hebra de RNA formando una estructura de ribonucleoproteína, rodeada por una membrana lipídica proveniente de la célula hospedera la cual contiene la proteína de membrana M de 7 a 8 kDa y la glucoproteína de la envoltura E (del tipo de proyecciones de superficie)

de 50 a 60 kDa. Las proteínas C, M y E se denominan estructurales (3).

La proteína E es el principal componente de la superficie de la envoltura del virión, ésta se encuentra glucosilada y contiene los determinantes antigénicos responsables de la hemaglutinación y neutralización durante la protección inmunológica en la infección, además contiene los dominios responsables de la unión de los viriones a los receptores celulares y los asociados a los procesos de fusión intraendosomal en un pH ácido durante la vía de entrada de los viriones (3).

La maduración de los flavivirus se lleva a cabo en membranas intracelulares del retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi y la duplicación en el espacio perinuclear y las membranas lisas del retículo endoplásmico, generándose dos tipos de viriones, el intracelular que contiene los heterodímeros prM-E los cuales mediante un procesamiento proteolítico generan la proteína E trimerizada y el virión extracelular que contiene las proteínas maduras C, M, y la glucoproteína E. El papel de las proteínas no estructurales en la biología de los flavivirus es entendido parcialmente, solamente se conocen algunos fenómenos relacionados a éstas como: la función de generar inmunidad protectora por parte de la proteína NS1; la actividad de proteasa y de helicasa nucleótido trifosfatasa de la proteína NS3 y el posible papel de RNA polimerasa de la molécula NS5 (3, 6).

Debido a que el desarrollo de la virología se aceleró con la capacidad de cultivar células *in vitro* es menester tratar brevemente la importancia del cultivo celular en el estudio de los flavivirus. El estudio de los mecanismos de propagación viral, adhesión, penetración, desrevestimiento, transcripción, traducción y maduración viral se han logrado comprender mejor gracias al cultivo celular, además de la ayuda de disciplinas como la biología molecular y la microscopía electrónica (15).

Para el estudio de los arbovirus es necesario contar con un sistema de cultivo de células de invertebrados y en especial de células de artrópodos, en el caso de los flavivirus se han establecido los sistemas de cultivo a partir de sus vectores (mosquitos o garrapatas).

Por ejemplo, para el caso del dengue se han usado las clonas **C6/36** (*Ae. albopictus*), APG1 (*Ae. pseudoscutellaris*) y TRA 284 (*Toxorhynchites amboinensis*); y la clona C17 de *Ae. aegypti* para el estudio del virus de la fiebre amarilla (14). Sin embargo, de hecho cualquier estirpe celular de las anteriores son susceptibles a la infección por arbovirus en general con cierto grado de especificidad dependiendo del virus y de las células.

Los cultivos celulares de artrópodos son importantes para definir y estudiar los receptores virales y sus interacciones con el virus además de la cooperación de los factores del hospedero en la duplicación viral

(restricción del hospedero a infecciones persistentes).

Los requerimientos nutricionales de estos sistemas de cultivo son bioquímicamente fundamentales y tienen relación con la concentración de metabolitos críticos, la acilación y glucosilación de proteínas así como la presencia de ácido siálico, glucolípidos de insectos, ácidos grasos, lípidos y lipoproteínas, esteroides, lectinas de invertebrados y biosíntesis de glucoproteínas (14).

Es de especial importancia hacer notar que la clona C6/36 de mosquitos es permisiva a un intervalo grande de arbovirus incluso de aquellos poco relacionados a éstos como los Reovirus, Poliovirus, Enterovirus, Picornavirus, Paramyxovirus y Chordopoxvirus. Este ejemplo nos muestra el gran potencial que tienen las células de mosquito para mantener el crecimiento viral (14).

La clona C6/36 se obtuvo a partir de una selección por susceptibilidad a la infección con los cuatro serotipos del Dengue y el virus del Chikungunya en un cultivo de células de larvas y embriones de *Ae. albopictus* genéticamente heterogéneos denominado cultivo SAAR que fue obtenida por el Dr Singh (16). A partir del cultivo SAAR se aislaron 20 clones de los cuales al ser infectados con los arbovirus mencionados la clona C6 mostró los más altos títulos, al mismo tiempo la clona se adaptó a crecer en Medio Esencial Mínimo, posteriormente de la clona C6 se subclonó a otras 43 donde la clona 36 fue más sensible a la infección mostrando efectos citopáticos notables en comparación con el cultivo SAAR denominándose esta subclona **C6/36** (17).

La clona C6/36 creció inicialmente a una temperatura de 28°C; sin embargo, ésta ha sido adaptada a crecer a temperaturas de 32 a 34 °C, con lo cual no hay cambios en la susceptibilidad a la infección viral aumentando la tasa de duplicación en concentraciones bajas del virus dengue, lo que representa una ventaja para su aislamiento para el diagnóstico clínico (18).

Esta clona es usada para mantener y purificar flavivirus y en especial virus del Dengue hasta títulos altos. Las células no forman placas de adhesión a la superficie del recipiente de cultivo, no son tumorígenas y mantienen un número diploide de cromosomas.

Gracias a los estudios en estos cultivos se sabe que la célula hospedera proporciona los metabolitos y las funciones necesarias para la multiplicación de los arbovirus, en primer lugar una fuente de energía en forma de ATP; sistema de síntesis de proteínas; sistemas de transporte de proteínas de membranas (retículo endoplásmico y aparato de Golgi); sustratos para enzimas virales ATP, GTP, UTP y CTP en el caso de la RNA polimerasa y para la enzima responsable de la metilación del extremo 5' terminal del RNA mensajero los sustratos GTP y S-adenosilmetionina; enzimas glucosilantes y acilantes que modifican las proteínas de la

envoltura viral, etc (19).

Los virus son elementos intracelulares (porciones de información genética) con capacidad de infección que utilizan los mecanismos sintéticos de la célula hospedera para multiplicarse en un patrón muy específico experimentando un alto grado de integración con la célula manifestando las siguientes propiedades: unión viral, entrada y/o penetración, multiplicación intracelular, síntesis de subunidades, ensamblaje y liberación de la progenie viral (20,21). En los primeros eventos de la infección la mayoría de los virus interactúan inicialmente con la célula mediante la unión a la membrana celular a través de componentes de la superficie celular específicos y saturables llamados Receptores Virales (RVs).

La reacción de unión es mediada por Proteínas de Unión del Virus (PUVs) las cuales se encuentran en varias copias y son únicas para cada tipo viral de forma tal que la especificidad y afinidad de la interacción PUVs-RVs dirige el tropismo hacia células y tejidos y el intervalo de hospederos para el virus; la expresión de receptores en la superficie celular ha sido fuertemente correlacionado con la susceptibilidad de una célula a la infección.

En el caso de los flavivirus el fenómeno es poco conocido, no obstante se ha sugerido que utilizan dos mecanismos en los cuales la envoltura viral se fusiona con la membrana vesicular pinocítica o la membrana plasmática antes de la liberación del RNA viral en el citoplasma. Es decir los dos modos de entrada al parecer son : a) por endocitosis y b) por fusión directa con la membrana plasmática (14, 27). El mecanismo depende de factores como la "historia de pase" del virus que provoca la selección de una subpoblación en particular, la composición de lípidos y carbohidratos de la envoltura viral debidos a la célula hospedera y finalmente la célula blanco per se.

El fenómeno de entrada depende de manera directa de las actividades de la célula: toma de nutrientes, comunicación, transporte intracelular y actividades endocíticas (22, 23, 24).

La membrana plasmática participa esencialmente en los eventos de entrada, liberación y síntesis de componentes virales provenientes de membranas subcelulares, debido a lo anterior observamos la aparición, durante el curso de la infección en un cultivo celular, de un Efecto Citopático (ECP) en el cual cambia la morfología de las células infectadas presentándose aglutinación, fusión, cambios en el patrón de crecimiento así como también el reconocimiento entre células (25, 26).

Durante la infección del virus se aprecian dos fenómenos principalmente: **Fusión de membranas** en la cual los virus son formados por la gemación o crecimiento con las membranas celulares u otro sistema de membranas de la vía secretora y la penetración viral por **Fusión de membranas** la cual sucede siempre en la membrana plasmática ya sea por

un virus con actividad de fusión a un pH neutro o posteriormente por endocitosis en vacuolas intracelulares con influencia de un pH ácido (25).

A partir de este comportamiento en los sistemas de membranas durante la infección viral se conocen muy bien dos fenómenos ya descritos hace tiempo relacionados a la fusión de membranas los cuales son : **Fusión Interna** que se observa inicialmente en células cultivadas infectadas en baja dosis de virus capaces de establecer fusión celular, esta sucede cuando la maduración o ensamblaje del virus en fases tardías de la infección coincide con la fusión celular, donde las proteínas de la progenie viral en la membrana plasmática se unen entre sí a las células vecinas. La **Fusión Externa** sucede cuando los viriones parentales son adsorbidos en la superficie celular fusionándose con la membrana plasmática, actuando como puentes que unen las membranas plasmáticas de las células adyacentes, este fenómeno ocurre independientemente de la duplicación viral y es inducido igualmente por virus infectivos o inactivados, donde la condición reside en que el virus debe exponerse en altas dosis, en un máximo de 1-3 horas post-infección, lográndose rápidamente la fusión (20, 26).

En algunas cepas del virus de la encefalitis japonesa (SA¹⁴) y del virus del dengue serotipo 2 (PR-159) el proceso de entrada en monocitos y células C6/36 es por inserción directa del virus en el citoplasma a un pH fisiológico donde la membrana plasmática se disuelve en el sitio de unión del virus, sin la formación de depresiones ó vesículas recubiertas que alberguen partículas virales. Algo similar se encontró en el proceso de entrada del virus de la encefalitis japonesa en híbridos de células neurogénicas cultivadas de ratón (células N18T62 y N6108-15) donde aparentemente el virus penetra directamente la membrana plasmática y el ensamblaje del virión ocurre en las cisternas del retículo endoplásmico rugoso lo que apoya la idea sobre la existencia de receptores virales que facilitan la adhesión viral y la entrada posterior a la célula (14).

Así, al parecer el virus de la encefalitis japonesa y el dengue entran directamente por inserción directa en el citoplasma por medio de fusión con la membrana plasmática .

El Ciclo de Transmisión y el Vector.

La importancia de los insectos hematófagos deriva del hecho de que la vida metazoaria terrestre predominante corresponde a los insectos, con 1 a 10 millones de especies existentes de las cuales aproximadamente solo 300 a 400 se alimentan de sangre siendo de gran importancia para el hombre y

los animales, estos grupos de insectos hematófagos son los Phtiraptera (piojos), Hemiptera (chinches), Siphonaptera (pulgas), Diptera (moscas y mosquitos), entre los que destacan simúlidos, ceratopogónidos, flebotómidos, tabánidos, rajiónidos, múscidos, califóridos, glosínidos, hipoboscidos y nyceterfidos, estiéblidos, atelcidos y los culcideos (al cual pertenece *Ae. aegypti*).

Las enfermedades cuyos agentes causales son transmitidas por insectos más importantes (O.M.S 1976) por el número de gente infectada y en riesgo son: la malaria, con los plasmodios transmitidos por mosquitos anofelinos, con 365 millones de gente infectada y con 2217 millones en riesgo; la elefantiasis o filariasis linfática transmitida por mosquitos (*Culex, Aedes, Anopheles y Mansonia*) con 90 millones de gente infectada y con 905 millones en riesgo; la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño transmitida por la mosca tse-tsé (*Glossina morsitans morsitans*) con 20,000 personas infectadas y con 50 millones en riesgo; la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas transmitida por chinches (*Rhodnius* ó *Triatoma*) con 15 a 20 millones de gentes infectadas y con 65 millones en riesgo. En la actualidad las enfermedades arbovirales van cobrando cada vez más importantes (28).

Los insectos que transmiten el virus dengue son el *Aedes aegypti*, el *Aedes albopictus*, el *Aedes mediovittatus* y otras especies del grupo *Aedes scutellaris*, los cuales son miembros de la subfamilia Culicinae de la familia Culicidae. El principal vector es el *Aedes aegypti* el cuál es un mosquito con hábitos domésticos guardando una estrecha relación con el hombre. Este vector se cría en agua almacenada en recipientes domésticos, cisternas, tambos, llantas, floreros, cubetas, hojas de plantas etc, donde son depositados los huevos (1).

Aedes albopictus es un vector secundario del virus dengue pero se ha sugerido que es más susceptible a la infección oral (horizontal) ó transovárica (vertical) y es el principal responsable de brotes de dengue en Japón, el sur de China y algunas zonas de Asia (2, 29).

La transmisión del virus dengue es del tipo biológico propagativo en la cual el patógeno se multiplica en el insecto sin mostrar desarrollo ontogenético. El ciclo de transmisión del virus comienza con la sangre ingerida por el mosquito. Esta es depositada en la parte posterior del intestino medio de la hembra, el cual consiste de una capa de células epiteliales rodeada de una membrana basal. Si esta sangre está infectada, entonces los virus invaden a las células epiteliales duplicándose y pasando posteriormente al hemocele; el tiempo que transcurre entre la alimentación por sangre (infección) y la transmisión viral recibe el nombre de período de incubación extrínseco (30).

La ingestión de sangre en los mosquitos hembras conduce la aparición

de ciclos gonotróficos o reproductivos que son inducidos por la alimentación por sangre hasta la satedad, que implica procesos de digestión, maduración de los oocitos y la ovoposición. En este momento se puede llevar a cabo la transmisión vertical o transovárica en la cuál el virus entra en los oocitos y son transmitidos a la siguiente generación de mosquitos (30).

Los aspectos entomológicos más relevantes en relación a la transmisión de la enfermedad del dengue son la Capacidad Vectorial el cual se establece como el efecto combinado de los factores fisiológicos y ecológicos del vector, del hospedero, del parásito y el ambiente que determina si el mosquito puede transmitir el agente infeccioso y la Competencia Vectorial que se refiere a la fase de duplicación del patógeno dentro del insecto, aunque algunos autores señalan estos términos como sinónimos (2, 29).

La enfermedad de arbovirus es influida por el vector y su nicho ecológico, la frecuencia, naturaleza y duración de la exposición del hombre a vectores infectados y por la presencia de vertebrados amplificadores de la infección como caballos, pájaros, puercos, roedores, etc, así como también la disponibilidad del hombre para completar el ciclo artrópodo-vertebrado.

Los principales factores intrínsecos de la capacidad vectorial son los factores genéticos del vector que origina que existan diferencias en la susceptibilidad de las hembras para poder infectarse y transmitir los arbovirus, es decir, la existencia de poblaciones de mosquitos y virus genéticamente cambiantes.

Hay factores externos que afectan la capacidad vectorial como la temperatura y la nutrición. La temperatura tiene efecto en el periodo extrínseco de incubación en la proliferación viral y en el desarrollo del mosquito en la fase larvaria. La nutrición escasa en la época larvaria promueve en algunos casos una eficiente transmisión de los arbovirus (30).

En algunas zonas de Asia y Africa Occidental el virus del dengue se transmite en un ciclo zoonótico ó selvático en el cual un grupo de animales en un momento y región determinado son afectados por un patógeno, aquí el ciclo de transmisión lo integran primates no humanos y mosquitos del dosel selvático, el ciclo zoonótico ofrece un mecanismo potencial para el surgimiento de la enfermedad en poblaciones humanas puesto que los asentamientos humanos cada vez se expanden más a zonas aisladas y para la selección de variantes virales con un intervalo de hospedero alterado. Las cepas virales en el ciclo selvático son distintas (estudios de secuencias) indicando que el ciclo zoonótico está aislado geográfica y ecológicamente (2, 3)

Por otra parte, *Aedes aegypti* es un insecto originario de Africa el cual posteriormente por los medios de transporte, el comercio y la urbanización se hizo practicamente cosmopolita, por lo que el vector

emergió de un ambiente silvícola (bosques) a un ambiente doméstico y urbano en nuestros tiempos.

El mecanismo de infección por arbovirus en el estómago del mosquito sucede a través de varios eventos, el primero es la existencia de un receptor viral en la membrana de las microvelocidades de la superficie del epitelio del intestino medio, en estas células el virión penetra, pierde su envoltura y se multiplica en el citoplasma, la liberación de las partículas virales ocurre en el espacio extracelular por encima de la lámina basal (13, 31).

Dentro del cuerpo de los insectos, el arbovirus se enfrenta a una serie de barreras las cuales tiene que atravesar a una determinada dosis viral para completar su ciclo de transmisión.

La primera llamada *Barrera Mesentérica* ocurre en las capas de las células epiteliales del intestino medio y se cree que es influenciada por mecanismos como la inactivación viral por fluidos digestivos, la impermeabilidad de la membrana peritrófica, la variación en la permeabilidad de las células intestinales, la distribución y cambios de la carga de la superficie celular, los escasos sitios de receptor viral específico y los mecanismos de defensa de la superficie celular del intestino. En estudios con el dengue serotipo 2 en *Ae. albopictus* se observa que los viriones se localizan en la parte posterior del mesenterón.

La *Barrera de Escape Mesentérica* ocurre en la lámina basal que es una membrana porosa de muchas capas. Una vez en el hemocele los viriones tienen una amplificación secundaria en células y tejidos asociados, cuerpo graso, proventrículos, la cubierta ovárica y el tejido nervioso; esta amplificación es necesaria para la posterior infección en glándulas salivales cuando en el intestino medio las concentraciones del virus son bajas.

Posteriormente, en la *Barrera de Infección en Glándulas Salivales* la penetración del virus se realiza a través de la membrana basal que rodea a las glándulas salivales, el virus posteriormente va hacia la membrana plasmática de las células acinares, y los lóbulos laterales de las glándulas salivales son infectadas.

Finalmente, se dirige a la *Barrera de Escape en Glándulas Salivales* donde los viriones son liberados a la saliva en la cual el vector al momento de picar un hospedero nuevo completa el ciclo de transmisión.

Se han sugerido otras barreras como la *Barrera de Transmisión Transovárica* que se localiza en las estructuras del tracto reproductivo de la hembra durante la transmisión vertical del virus.

Control Inmunológico de Vectores.

Algunos artrópodos hematófagos y mamíferos son los vectores y hospederos respectivamente de agentes causales de padecimientos y enfermedades de importancia médica y veterinaria, estos agentes pueden ser virus (arbovirus), bacterias, protistas parásitos y gusanos que desarrollan parte a la totalidad de su ciclo de vida o proliferación en el vector.

En el estudio de modelos epidemiológicos se nota que la expansión de una enfermedad causada por artrópodos hematófagos depende de la **fecundidad del vector** y la **tasa de transmisión** del agente infeccioso; debido a esto, la supresión de las poblaciones de vectores es una de las principales estrategias de control en la transmisión de la enfermedad.

Actualmente el control del vector se ha logrado con el uso de insecticidas y acaricidas químicos que reducen de manera notable las poblaciones en lugares endémicos o de alta incidencia. Sin embargo, se presentan varios problemas en el vector como es el desarrollo de resistencia, variabilidad genética, dinámica reproductiva y tasa de mutación. Así mismo, el tipo de químico usado, frecuencia de aplicación, la exposición, el efecto nocivo a otras especies, los residuos en los alimentos y los daños a la salud humana hacen que este medio de control sea contraproducente a largo plazo por sus graves efectos colaterales a su aplicación (32, 33).

Desde hace tiempo se conoce un fenómeno inmunológico observado en el ganado y en animales de laboratorio denominado **Resistencia Adquirida** que es provocado por la infestación de ácaros, garrapatas, mosquitos, glosínidos y malófagos que se alimentan en la piel de estos hospederos.

La resistencia adquirida se manifiesta como una reducción en la infestación de artrópodos por la acción de ciertos mecanismos inmunológicos del hospedero, esta reducción se observa como una disminución en el número de artrópodos alimentados, reducción en su contenido alimenticio sanguíneo, un decremento en la cantidad y viabilidad de los huevos, dilatación en el tiempo de alimentación y perturbaciones en la fisiología del vector que globalmente provocan un aumento en la mortalidad de las poblaciones del vector. Los mecanismos inmunológicos del hospedero vertebrado consisten en la inmunidad humoral y celular. La inmunidad humoral está constituida por anticuerpos homocitotrópicos, reacciones de hipersensibilidad basófila cutánea, acción de complemento, histamina, prostaglandinas e interferón. Este fenómeno de resistencia adquirida provoca un desarreglo en la transmisión de agentes patógenos debido a la creación de un ambiente hostil debido a la respuesta inmune intensa del hospedero hacia el vector hematófago (34, 35).

Por ejemplo, las secreciones de glándulas salivales de garrapata que interactúan con el hospedero durante la infestación cambian durante el curso de la alimentación y contienen una gran variedad de inmunógenos y moléculas farmacológicamente activas que favorecen la alimentación del artrópodo pero al mismo tiempo son las responsables de la adquisición de resistencia. Dentro de este grupo hay antígenos con fuerte actividad antihemostática, anti-inflamatoria, inmunosupresora, son las apirinas, prostaglandinas, cinasa salival, anticoagulinas, anafilatoxinas y prostacilinas las cuales han sido identificados en la saliva. En los casos de la garrapata su saliva modula la respuesta inmune del hospedero vertebrado (36, 37).

Recientemente se vislumbra un mecanismo alternativo de control de poblaciones de vectores llamado **Control Inmunológico** que consiste en la inducción de la respuesta inmune de los hospederos mamíferos por medio de inmunizaciones artificiales con moléculas de antígeno provenientes de algunos órganos internos del artrópodo vector, como por ejemplo glándulas salivales, intestino medio, abdomen, tórax, alas, extractos totales del vector, etc; e incluso extractos de simbioses intestinales del vector (38).

Esta respuesta inmune podría influir en la transmisión del patógeno de varias maneras: 1) Reduciendo la fecundidad, sobrevivencia, y longevidad del vector por los daños producidos en su tracto intestinal y reproductivo debido a la acción de anticuerpos, complemento y leucocitos del hospedero 2) Modula la transmisión del patógeno por hospederos infectados a vectores reduciendo el contacto hospedero-vector por medio de reacciones de hipersensibilidad cutánea del hospedero o bloqueando el desarrollo del patógeno en el artrópodo (e.g. anticuerpos anti-intestino medio del mosquito) 3) Afectaría la transmisión de patógenos de vectores infectados a vertebrados provocada por el ambiente inmune hostil generado en el sitio de la picadura que disminuiría la expansión del patógeno en el vertebrado (32).

Los anticuerpos anti-mosquito generados en hospederos vertebrados (conejos y roedores) podrían afectar la fisiología del vector y la infectividad de parásitos y arbovirus.

Por ejemplo, los anticuerpos generados en conejos contra antígenos de cabeza, tórax, abdomen e intestino medio de *Anopheles tessellatus* alimentados con azúcar que fueron evaluados en la alimentación de *An. tessellatus* y *Culex quinquefasciatus* mostraron que esos anticuerpos reducen el número de huevos producidos por *An. tessellatus* sin tener este mismo efecto en *Cx. quinquefasciatus*; por el contrario estos anticuerpos aumentaron la mortalidad de *Cx. q. quinquefasciatus* y no tuvieron efecto en la mortalidad de *An. tessellatus*. Estos son resultados preliminares del uso de estos anticuerpos sobre la fecundidad y mortalidad de los vectores, no

obstante requieren de más estudios para identificar los antígenos blanco relevantes (39).

En el caso de la malaria se observó que anticuerpos de ratón anti-intestino medio de *Anopheles farauti* reduce la infectividad (cantidad de oquistes desarrollados de *Plasmodium berghei*) sin afectar la sobrevivencia del insecto siendo el efecto más notable en antígenos de mosquitos alimentados con azúcar en contraste a los alimentados con sangre. Podría ser que anticuerpos dirigidos contra intestinos de mosquitos alimentados con sangre contienen membranas peritróficas, tripsina y otras enzimas digestivas que ocultan la generación de un anticuerpo dirigido contra el receptor al oquineto en el intestino medio provocando que un mayor número de oquinetos penetren el intestino y produzcan parasitemia a diferencia de los anticuerpos anti-intestino medio de mosquitos alimentados con azúcar donde el bloqueo a la penetración del oquineto en el intestino medio es más efectivo por no contener los antígenos adicionales de un mosquito alimentado con sangre (40).

En un estudio se encontró que mosquitos de *Aedes aegypti* alimentados con una mezcla de anticuerpos de conejo anti-intestino medio del vector reducen significativamente la susceptibilidad a la infección de dos arbovirus: el del Río de Ross y el virus de la encefalitis del Valle de Murray (Alfatogavirus y Flavivirus). Sin embargo, no afectan los títulos virales en mosquitos infectados ni bloquea la transmisión del virus de mosquitos infectados a vertebrados sanos (41).

La reducción en la susceptibilidad a la infección puede ser debido a la perturbación en la interacción de los anticuerpos en los receptores para los virus en las células epiteliales del intestino medio (seguramente impedimento estérico). Sobre la forma en que el virus se introduce en el epitelio del intestino medio se establece que pueden haber dos mecanismos: a) por fusión de membranas como en el caso del alfavirus causante de la encefalomielititis del Oeste cuyo vector es *Culex tarsalis* o b) por la unión de viriones a los receptores de superficie celular seguida de endocitosis observado para el caso del flavivirus de la encefalitis de San Luis en el intestino medio de *Culex pipiens* (41).

De esta manera la inmunidad inducida artificialmente contra artrópodos es una estrategia promisoría para el control de la transmisión de las enfermedades causadas por patógenos de importancia médica y veterinaria, con especial atención en la generación de anticuerpos dirigidos contra componentes relevantes del intestino medio de los artrópodos que funcionan como receptores para parásitos y arbovirus.

En base a estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos :

Objetivos Generales :

1.- Evaluar la reactividad de los anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Aedes aegypti* sobre células C6/36, mediante técnicas inmunoquímicas (ELISA Indirecta, Inmunofluorescencia Indirecta e Inmunoelectrotransferencia).

2.- Identificar los polipéptidos reconocidos por el virus del Dengue Serotipo 2 en ensayos de unión viral utilizando extractos de proteínas de células C6/36 electrotransferidas en membranas de nitrocelulosa.

Objetivos Particulares :

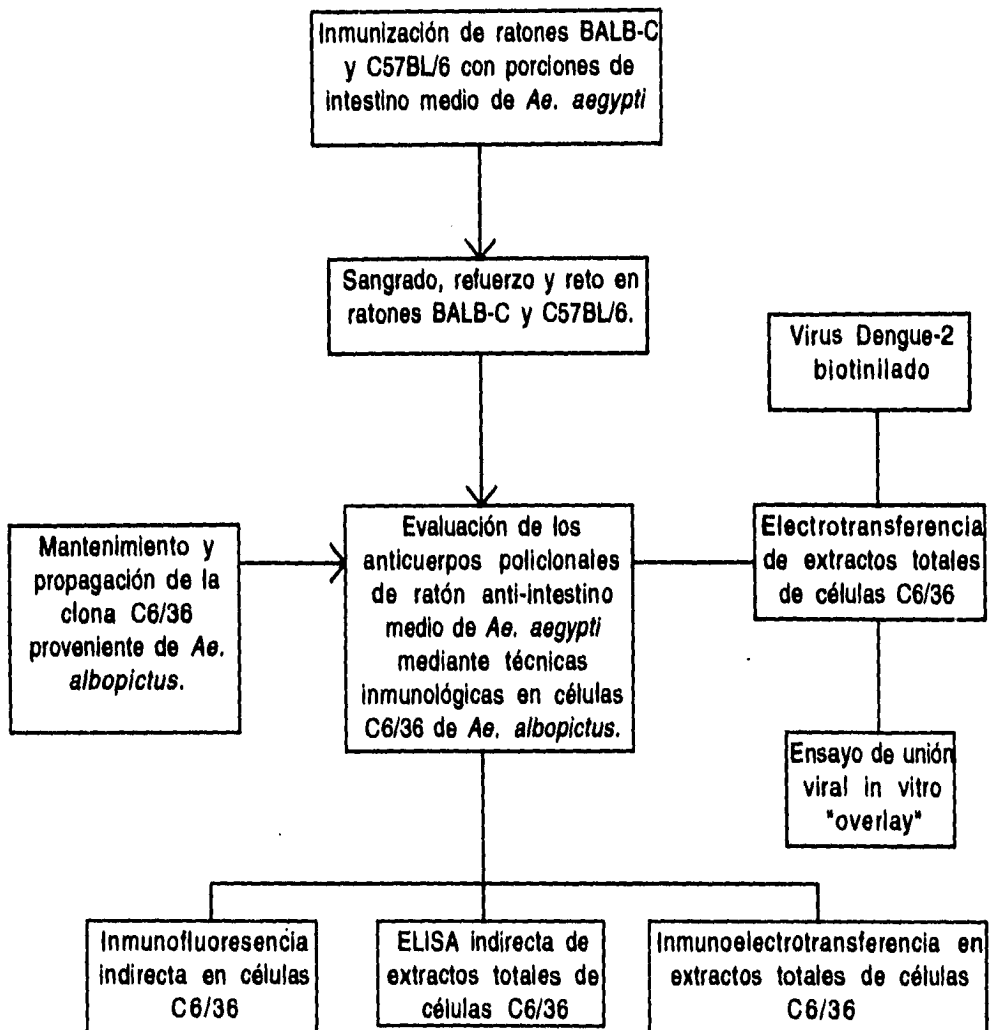
1.- Determinar por ELISA indirecta en extractos totales de células C6/36, la especificidad a estas células de una colección de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Aedes aegypti*. Seleccionar los sueros positivos.

2.- Identificar los polipéptidos de extractos totales de células C6/36 mediante inmunoelectrotransferencia con los sueros policlonales anteriormente seleccionados.

3.- Evaluar por inmunofluorescencia indirecta, en células C6/36, la distribución de los antígenos reconocidos por los sueros positivos seleccionados por ELISA.

3.- Seleccionar los anticuerpos con mayor reconocimiento.

En base a estos objetivos nos planteamos el siguiente diseño experimental:



MATERIALES Y METODOS.

Cuantificación de proteínas.

Método de Bradford (42).

El reactivo se preparó con 100 mg de azul de Coomassie G-250 (Sigma), 50 ml de alcohol etílico, 100 ml de ácido orto-fosfórico al 85% y se aforó a 1 litro.

La solución se filtró a través de un papel filtro (Wathman #1).

Se utilizaron volúmenes de muestra de 5 μ l aforadas a 100 μ l con agua destilada y se les adicionó 1 ml de reactivo.

La curva patrón se preparó con albúmina sérica bovina (Sigma) a una concentración de 1 mg/ml. Se leyó la absorbencia de los tubos en el espectrofotómetro a 595 nm y la concentración de proteína se determinó por interpolación en la curva patrón.

Método de Lowry (43).

Se preparó el reactivo alcalino mezclando 0.25 ml de solución al 2% de Tartrato de Sodio y Potasio y 0.25 ml de solución al 1% de $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 25 ml de solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N.

La solución de proteína problema se utilizó en volúmenes de 5 μ l aforados a 100 μ l con agua bidestilada. Posteriormente se les agregó 1 ml de reactivo alcalino, se agitó y se dejó reposar 10 minutos, después se adicionó 0.1 ml de solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 con agua destilada) agitando al mismo tiempo.

Treinta minutos después se leyó con una absorbencia a 750 nm.

La curva patrón se realizó con concentraciones de albúmina sérica bovina en un intervalo de concentración de 5 a 100 μ g de proteína partiendo de una solución original de 1mg/ml. Se leyeron al espectrofotómetro y para calcular la concentración de proteína problema el valor de absorbencia se interpoló a la curva patrón.

Cultivo celular de la clona C6/36 proveniente de *Aedes albopictus*.

Medio de Cultivo (1 litro).

Medio Esencial Mínimo de Eagle (Gibco) 10X.	100 ml.
Suero Fetal Bovino (Boehringer).	100 ml.
Aminoácidos no esenciales 100X (Gibco).	10 ml.
Vitaminas 100X (Sigma).	10 ml.
Glutamina 200 mM (Sigma).	20 ml.
Bicarbonato de Sodio.	0.35 gr.
Agua destilada estéril.	750 ml.
Solución de antibióticos 100X (Sigma).	10 ml.

El pH se ajustó a 6.8 y la concentración del suero se redujo a 5% para mantenimiento de las células. La temperatura de mantenimiento fue de 32 a 34°C.

El suero fetal bovino se inactivó por calentamiento en un baño maría de 56°C durante 30 minutos.

Propagación.

La propagación se hizo en cajas de cultivo (Costar) donde las células se adhieren a la superficie, con un volumen de 10 ml de medio de cultivo en cada caja.

El pase de células se hizo de 1 caja que alcanzó la confluencia (generalmente tres días) a 3, partiendo de una densidad celular de alrededor 30×10^6 células por caja.

La suspensión celular se obtuvo adicionando medio fresco agitándolo contra la superficie de la caja con ayuda de una pipeta estéril sin hacer burbujas, y se repartió a otras cajas.

Una vez que se reunieron alrededor de 40 a 60 cajas confluentes se procedió a cosecharlas para lo cual se retiró el medio de cultivo hasta dejar un volumen de 1 ml, con la ayuda de un gendarme se hizo una suspensión que posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por cinco minutos, se lavaron tres veces y se guardaron a -70°C.

Congelación.

Esto se realizó con el propósito de preservar a las células por tiempo indefinido.

A partir de cajas de cultivo subconfluentes, es decir 24 horas después del pase con el fin de tener a las células en las mejores condiciones, se suprimió el medio de cultivo y se adicionó 2 ml de medio de congelación por caja que contenía dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% y suero fetal bovino al 15% en medio de cultivo, con la ayuda de un gendarme estéril se hizo una suspensión de células concentradas (10×10^6 células) que se alicuotaron en criotubos fríos.

El proceso de congelación debe ser lo más lento posible para asegurar una alta viabilidad, los criotubos se colocaron en bolsas de papel y se guardaron por dos horas a 4°C para posteriormente depositarlos a -70°C por toda la noche. Después se colocaron en vapores de nitrógeno líquido por cuatro horas y finalmente se sumergieron en este.

A los dos días se descongeló un criotubo para verificar si la congelación tuvo éxito.

Descongelación.

El criotubo recién sacado del nitrógeno líquido se colocó rápidamente en un baño maría a 37°C agitándolo hasta dejar visible un pedacito de hielo, después se pasó a un baño de etanol al 70% para desinfectar la superficie externa del criotubo y estabilizar la temperatura.

Se vació rápidamente el criotubo en una caja de cultivo que contenía 20 ml de medio de cultivo fresco con el fin de diluir lo más posible el DMSO.

Al cabo de 4 horas cuando las células se adherieron a la superficie de la caja, se retiró el medio de cultivo y se le agregó medio fresco.

Electroforesis de Proteínas.

Preparación de las muestras.

Las muestras se disolvieron en amortiguador del sistema de Laemmli (44) que contenía Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS 10% (p/v), glicerol 10%, 2- β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol al 0.05% (p/v).

La muestra se diluyó 1:5 con este amortiguador y se calentó a ebullición por cinco minutos.

Preparación de geles.

Se montaron geles planos en una cámara de electroforesis con una concentración de acrilamida/bisacrilamida al 7.5 % en el gel separador.

Los geles se prepararon de acuerdo con las siguientes soluciones madre:

Soluciones	Gel separador (10 ml)	Gel concentrador (5ml)
Agua bidestilada	4.85 ml	3.05 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	2.5 ml	
Tris-HCl 0.5M pH 6.8		1.25 ml
SDS al 20%	50 μ l	25 μ l
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	2.5 ml	0.65 ml
Persulfato de Amonio al 10%	50 μ l	25 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Los geles se dejaron polimerizar de 20 a 30 minutos. El amortiguador de corrida estaba constituido por 3 gr de Tris base, 14.4 gr de glicina y 5 ml de SDS al 20% por cada litro de solución, los geles se dejaron correr por 1.5 horas a 150 mV.

Las dimensiones de los geles fueron de 8.3 x 5.5 cm para el separador y de 8.3 x 2 cm para el concentrador con un espesor de 1.0 mm.

Tinción de geles con azul de Coomassie.

La tinción se hizo durante 20 minutos a temperatura ambiente con solución de Coomassie que contenía: metanol 227 ml, ácido acético 46 ml, agua bidestilada 227 ml y azul de Coomassie G-250 1.25 gr.

Se quitó el colorante y se colocó en solución desteñidora compuesta de metanol 600 ml y ácido acético 200 ml aforado a 2 litros con agua bidestilada, se realizaron cambios de solución hasta que las bandas de proteína se hicieron visibles.

Inmunización de ratones BALB-C y C57BL/6 con porciones de Intestino de *Aedes aegypti*.

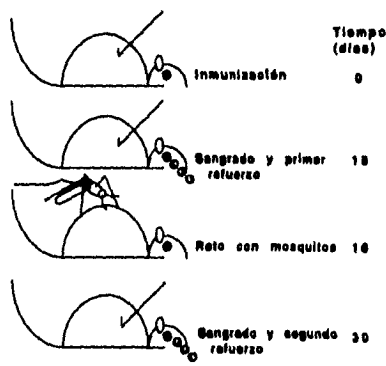
Se inmunizaron un conjunto de ratones hembra de 6 semanas de edad de las cepas BALB-C y C57BL/6 (*inbred*) de acuerdo a las condiciones descritas en la Figura 1, las inmunizaciones se hicieron con porciones de intestino medio de *Ae. aegypti* y en solo tres casos se empleó matriz peritrófica del mismo insecto empleando adjuvante completo de Freund (Titer-Max). Se sangraron por el ojo de acuerdo a la fecha que indica la clave del antisuero.

La vía de inmunización fue en los cojinetes plantares de un pie con un volúmen de 50 μ l.

Las condiciones de inmunización fueron las siguientes :

Figura 1: Estrategia de inmunización con porciones de intestino medio de *Ae. aegypti* en ratones de las cepas BALB-C y C57BL/6.

Cepa BALB-C		
Jaula	Ratón	Condiciones de Inmunización.
A	1,3	Adjuvante
B	1,2,3	Adjuvante
C	4,5,6	Adjuvante+ antígeno (100 μ g)
D	7,8,9	Adjuvante+ antígeno (100 μ g)
E	1,2,3	Adjuvante+ antígeno (100 μ g)
Cepa C57BL/6		
Jaula	Ratón	Condiciones de Inmunización.
J	1,2,3,4	Adjuvante
K	5,7,8	Adjuvante+ antígeno (25 μ g)
L	6,7,9	Adjuvante+ antígeno (50 μ g)
M	5,6,7	Adjuvante+ antígeno (100 μ g)
N	5,7,8	Adjuvante+ antígeno (50 μ g)



Tiempo (días)

0

18

30

etc

Tabla 1: Protocolo de inmunización con porciones de intestino medio de *Ae.aegypti* en ratones BALB-C.

Clave de suero por ratón	Cantidad de proteína (µg)	Refuerzos	Sangrados	Retos
A1 8-13-92	-	-	-	-
A3 8-13-92	-	-	-	-
B1 8-13-92	-	-	-	-
B2 8-13-92	-	-	-	-
B3 8-13-92	-	-	-	-
C4 8-13-92	100	2	17	5
C6 8-13-92	100	2	14	5
C4 6-15-92	100	2	11	5
C5 6-15-92	100	2	8	5
C6 6-15-92	100	2	8	5
D7 8-13-92	100	2	21	5
D9 8-3-92	100	2	14	5
D7 6-15-92	100	2	15	5
D8 6-15-92	100	2	8	5
D9 6-15-92	100	2	8	5
CD 7-20-92	100	2	21	5
CD 7-27-92	100	2	20	5
E1 6-1-92	100 matriz	-	-	-
E2 6-1-92	peritrofica	-	-	-
E3 6-1-92	100 matriz	-	-	-
	peritrofica			

Tabla 2 : Protocolo de inmunización con porciones de intestino medio de *Ae.aegypti* en ratones C57BL/6.

Clave de suero por ratón	Cantidad de proteína (µg)	Refuerzos	Sangrados	Retos
J1 7-27-92	-	-	-	-
J2 6-29-92	-	-	-	-
J3 7-27-92	-	-	-	-
J4 8-12-92	-	-	-	-
K5 7-27-92	25	2	6	1
K5 8-3-92	25	2	8	2
K5 8-12-92	25	2	9	3
K7 7-27-92	25	2	3	1
K7 8-12-92	25	2	4	3
K7 6-29-92	25	2	3	1
K7 7-13-92	25	1	2	1
K8 7-27-92	25	2	3	1
K8 8-12-92	25	2	4	3
K8 7-13-92	25	1	2	-
L6 7-27-92	50	2	3	1
L6 8-12-92	50	2	4	3
L6 7-13-92	50	1	2	-
L7 8-12-92	50	2	4	3
L7 7-13-92	50	1	2	-

Clave de suero por ratón	Cantidad de proteína (µg)	Refuerzos	Sangrados	Retos
L9 7-27-92	50	2	3	1
L9 7-13-92	50	1	2	-
M5 7-27-92	100	2	6	1
M5 8-3-92	100	2	7	2
M5 7-13-92	100	1	5	-
M6 7-27-92	100	2	3	1
M6 8-12-92	100	2	4	3
M6 7-13-92	100	1	2	-
M7 7-27-92	100	2	3	1
M7 7-13-92	100	1	2	-
N5 7-13-92	50	1	2	-
N7 7-27-92	50	2	3	1
N7 8-12-92	50	2	4	3
N7 7-13-92	50	1	2	-
N8 7-27-92	50	2	3	1
N8 8-12-92	50	2	4	3
N8 7-13-92	50	1	2	-

Extracción de proteínas del intestino medio de *Aedes aegypti*.

Primeramente se preparó el siguiente coctel de inhibidores de proteasas:

Iodoacetato	1 mM.	
Leupeptina	1 mM.	
PMSF	1 mM.	
PHMB	1 mM.	en Tris-HCl 1M pH=7.2.

La leupeptina y el iodoacetato se disolvieron directamente en agua, el PHMB se disolvió en 150 μ l de Tris-base 1M más 850 μ l de agua destilada, el PMSF se disolvió en 500 μ l de etanol más 500 μ l de Tris-HCl 1M evitando que se precipite. Se vertieron 50 μ l del coctel de inhibidores de proteasas (CIP) en cada vial donde se colectaron los estómagos de los mosquitos. Se lisaron con un homegenizador de vidrio con 3 a 5 golpes. Todo este proceso se llevó a cabo a 4°C.

Finalmente se cuantificó proteínas por el método de Bradford.

Realización de pruebas de ELISA Indirecta (Ensayo Inmunoabsorbente unido a Enzima) con los anticuerpos de ratón anti-intestino medio de *Aedes aegypti* sobre extractos de células C6/36.

Se sensibilizó una placa para ELISA (Dynatech Immunon 1) con un extracto de células C6/36 lisadas en un amortiguador de carbonatos pH 9.6 (en evaluaciones previas se empleo extracto de intestino medio de *Ae. aegypti*), 10 μ g por pozo en un volumen de 50 μ l. Se incubó a 4°C toda la noche.

Se desechó el líquido y se lavó tres veces por cinco minutos con solución amortiguadora de lavado TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH= 7.5 Tween 20 al 0.05%). Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con solución amortiguadora de bloqueo (TBS gelatina 0.05%) con un volumen de 200 μ l por pozo 1 hora a 37°.

Nuevamente se desechó el líquido y se lavó tres veces con la solución amortiguadora de lavado, posteriormente se incubó el antisuero de ratón correspondiente con las diluciones previstas (1:500, 1:1000, 1:2000,

1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000 y 1:64000) en la solución amortiguadora de bloqueo toda la noche a 4°C en un volumen de 50 µl.

Se desechó el líquido y se lavó tres veces con la solución amortiguadora de lavado, se adicionó un anticuerpo de conejo anti-Inmunoglobulinas (Igs) de ratón biotinilado (Amersham) diluido 1:500 en solución amortiguadora de bloqueo por una hora a 37°C en un volumen de 50 µl.

Se desechó el líquido y se lavó tres veces. Se incubó con fosfatasa alcalina conjugada a estreptoavidina (Amersham) diluida 1:2000 en solución amortiguadora de bloqueo por 1 hora a 37°C en un volumen de 50 µl y se lavó nuevamente tres veces.

La reacción se reveló a temperatura ambiente por 15 minutos con el siguiente sustrato que contiene fosfato de nitrofenol (PNPP) 2.5 mM, MgCl₂ 0.5 mM en amortiguador de dietanolamina 10 mM. Es una reacción soluble en agua y de color amarillo que absorbe luz a 405 nm (45). Las placas se leyeron en un lector de placas (Bio-Rad).

Realización de pruebas de Inmuno-electrotransferencia con los anticuerpos de ratón anti-Intestino medio de *Aedes aegypti* sobre extractos de células C6/36.

Electrotransferencia (46).

Se hicieron geles preparativos que corrieron en las condiciones descritas para la electroforesis de proteínas, en el carril grande del gel se colocó muestra con una cantidad de 500 µg de proteína de extractos de células C6/36 y en el otro carril se adicionó marcadores de baja o alta masa molecular preteñidos (Bio-Rad). Los tamaños de los marcadores fueron para los de alto peso de 205, 116.5, 80 y 49.5 kDa mientras que para los de bajo peso fueron de 106, 80, 49.5, 32.5, 27.5 y 18.5 kDa. Se sacó el gel de la electroforesis y se equilibró una hora en amortiguador de transferencia frío que contenía Tris base 0.03 g, glicina 14.4 g, metanol al 20% aforado a un litro con agua bidestilada.

La membrana de nitrocelulosa fué de 22 µm que se equilibró también una hora en el amortiguador. Para la transferencia se llenó la cámara con amortiguador y se siguió el siguiente orden de colocación : cátodo(-), panel, fibra, papel filtro, gel, membrana, papel filtro, fibra, panel y ánodo(+).

Se colocó la cubierta de la cámara y se puso en posición vertical. La transferencia se realizó en la cámara respectiva por una hora a 100

mV y 250 mA al comienzo y al final 100 mV y 350 mA.

El papel de nitrocelulosa se lavó una vez con TBS, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con leche descremada en polvo al 5% en TBS-Tween 20 0.05% (solución bloqueadora) durante una hora.

Después se efectuaron tres lavados de 1 minuto y tres de 5 minutos dejando la membrana transferida a temperatura ambiente sobre papel filtro para después colocarlos a -20°C .

Inmunodetección.

En tiras delgadas de la membrana de nitrocelulosa se incubó primeramente el antisuero de ratón diluido 1:60 en TBS solución bloqueadora en un volumen de 1 ml toda la noche a 4°C , se lavó 5 veces por 5 minutos con TBS-Tween 20 0.05%, posteriormente se incubó con el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón biotinilado diluido (Amersham) 1:500 en TBS solución bloqueadora durante 20 minutos en un volumen de 1 ml. Se lavó 5 veces 5 minutos y se incubó con la enzima fosfatasa alcalina conjugada a estreptoavidina (Amersham) diluido 1:2000 en TBS-Tween 20 0.05%, leche en polvo 1% (solución bloqueadora) durante 20 a 30 minutos en un volumen de 1 ml posteriormente se lavó y se reveló la reacción con el siguiente sustrato.

Se prepararon las siguientes soluciones: Tris (Tris 0.1 M, MgCl_2 0.5 mM, pH 9.5), 30 mg de azul de nitrotetrazolio (NBT) disuelto en 1 ml de N,N-Dimetilformamida (DMF) al 70% y solución con 15 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato (BCIP) disuelto en 1 ml de DMF.

El sustrato se preparó mezclando 1 ml de solución de NBT y 1 ml de solución de BCIP en 100 ml de amortiguador de Tris, se empleó un volumen de 1 ml. La reacción es de color morada e insoluble en agua (47).

Reconocimiento por Inmunofluorescencia Indirecta con los anticuerpos de ratón anti-Intestino medio de *Aedes aegypti* sobre células C6/36.

Se sembraron células en confluencia sobre cubreobjetos estériles en una caja de cultivo.

Después se fijaron las células en solución de formaldehído y

glutaraldehído en PBS a una concentración de 1.85% y 0.02% respectivamente por una hora. Los cubreobjetos se colocaron en una cámara húmeda para evitar que se secan.

Posteriormente se agregó sobre el cubreobjetos una gota de solución permeabilizadora que contenía Azul de Evans 0.002%, Tritón 0.5% y glicina 1 M incubándose 15 minutos a 37°C posteriormente se lavó dos veces con PBS-Tween 20 0.05%.

Se agregaron directamente sobre el cubreobjetos 5 μ l del antisuero de ratón incubándose por una hora a 37°C lavándose posteriormente dos veces con PBS-Tween 20 0.05%. Se incubó posteriormente por una hora a 37°C con un anticuerpo de conejo anti-Igs de ratón biotinilado en una dilución 1:10 en PBS-Tween 20 0.05% colocando 5 μ l sobre el cubreobjeto.

Se lavó dos veces y se adicionó isotiocianato de Fluoreseína-estreptoavidina (Boehringer) en una dilución 1:20 en PBS-Tween 20 0.05% en un volumen de 5 μ l y se lavó finalmente. Los cubreobjetos se montaron con glicerol al 50% en PBS y se observaron en un microscopio de luz ultravioleta.

Adicionalmente se evaluó una mezcla de anticuerpos provenientes de ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con 25, 50 y 100 g de intestino medio de *Ae. aegypti* en una proporción 1:1:1:1 de los siguientes antisueros:

K7 7-13-92, L7 7-13-92, M5 7-13-92, M6 7-13-92 y M7 7-13-92.

Blotiniación del virus.

El paquete viral obtenido a partir de cultivos infectados de células C6/36 se precipitó con polietilenglicol (PEG), posteriormente el paquete se resuspendió en una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 1 M a un pH=9.5 y se incubó toda la noche con enzotina (Sigma) en DMSO con una proporción de 5 mg de biotina por cada 10 mg de proteína viral. A las 24 horas se centrifugó la solución a 10, 000x g por una hora y después se resuspendió en PBS para determinar posteriormente el grado de biotinilación por la técnica de inmunodot de manera directa y haciendo diluciones virales 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1000 y 1:10 000.

Ensayo de unión del virus Dengue Serotipo-2 en proteínas de células C6/36 electrotransferidas en papeles de nitrocelulosa.

Se llevó a cabo el procedimiento de electrotransferencia descrito ya anteriormente y utilizando tiras de papel de nitrocelulosa para realizar el ensayo.

Primeramente se lavaron las tiras 1 vez por cinco minutos en solución amortiguadora de lavado (TBS-Tween20 0.05%) posteriormente se incubó con el virus purificado biotinilado diluido en TBS (1:100) durante toda la noche a 40C.

Las tiras se lavaron tres veces por cinco minutos y posteriormente se incubaron con fosfatasa alcalina conjugada a estreptoavidina (Amersham) en una dilución 1:2000 por 20 minutos en un volumen de 1 ml a temperatura ambiente, después se lavó tres veces y se reveló con el sustrato utilizado en la inmunolectrotransferencia.

RESULTADOS.

Especificidad de anticuerpos policlonales de ratón anti-Intestino medio de *Ae.aegypti* en extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* y de Intestino medio de *Ae. aegypti* por ELISA Indirecta.

Previamente se tenían una colección de 56 sueros de ratón, de los cuales 47 provenían de ratones inmunizados con el intestino medio de mosquitos hembra.

Un cuadro de inmunización se presenta en las figura 1, tablas 1 y 2.

Con el objeto de investigar si estos sueros tienen reacción cruzada con las proteínas de células C6/36 se realizaron pruebas de ELISA, inmunofluorescencia e inmunoelectrotransferencia.

Los títulos de cada uno de los anticuerpos se obtuvieron de acuerdo a la dilución en la cual el valor de densidad óptica fue mayor a el valor del blanco y del suero normal.

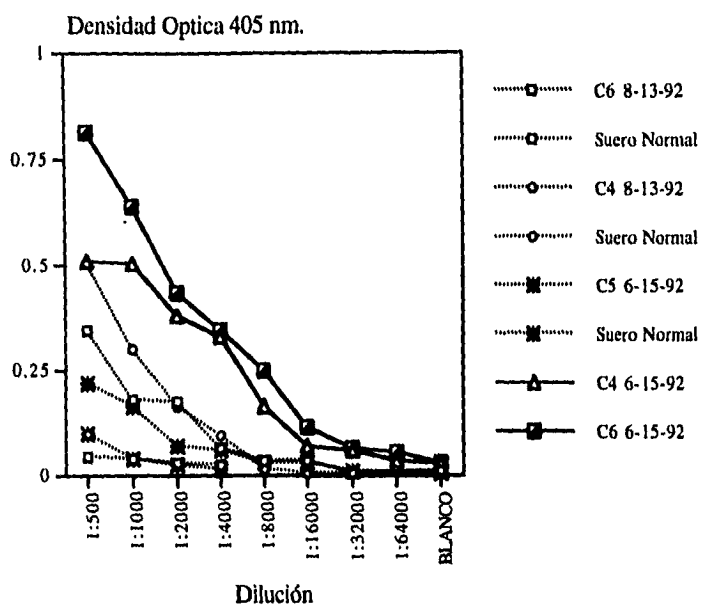
Los resultados de ELISA se pueden ver en la tabla 3 y 4 donde se observa que 35 de estos sueros reconocieron a las células C6/36. Para estas células los títulos variaron dentro del intervalo de 1:1000 a 1:64000 (graficas 1 a 8).

Esto comparado con el reconocimiento de antígeno de intestino medio es menor (tabla 3 y 4) .

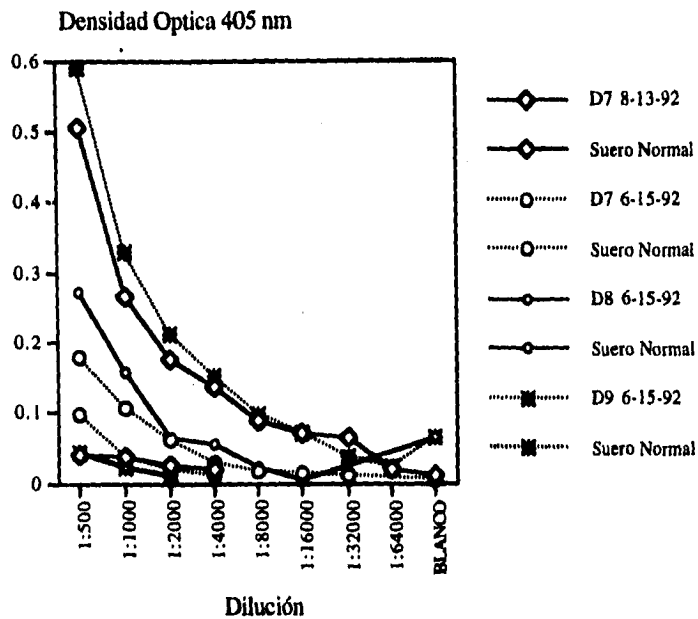
Los sueros E1, E2 y E3 que mostraron un título bajo fueron inmunizados con antígeno de la matriz peritrófica resultando negativos en células C6/36.

El título de los antisueros varió de acuerdo a la cantidad de antígeno que se empleó para inmunizar a los ratones.

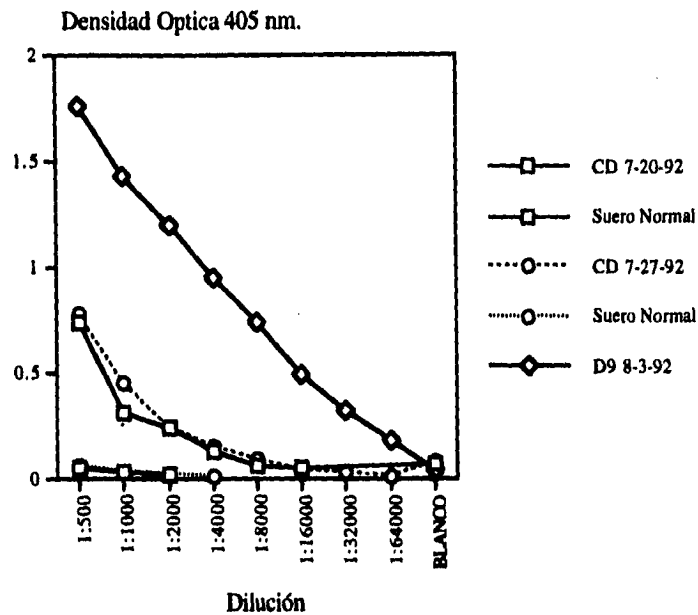
Así los títulos más bajos tanto cuando se empleó antígeno de estómago medio como cuando se empleó antígeno de células C6/36 fueron de los sueros obtenidos de ratones inmunizados con 25 µg de proteína y los títulos más altos se observaron cuando se emplearon 100 µg de proteína. Obviamente los títulos intermedios se observaron cuando se usaron 50 µg de proteína.



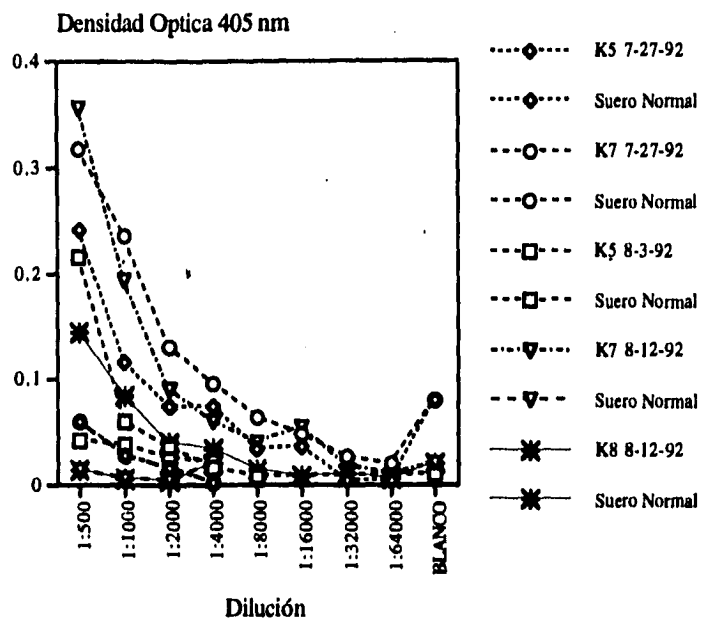
Gráfica 1: ELISA indirecta en células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones BALB-C fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



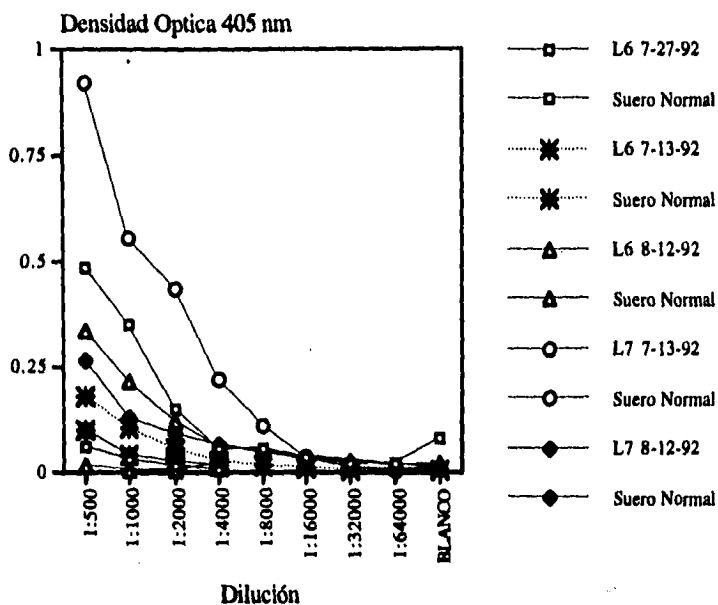
Gráfica 2: ELISA indirecta en células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones BALB-C fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



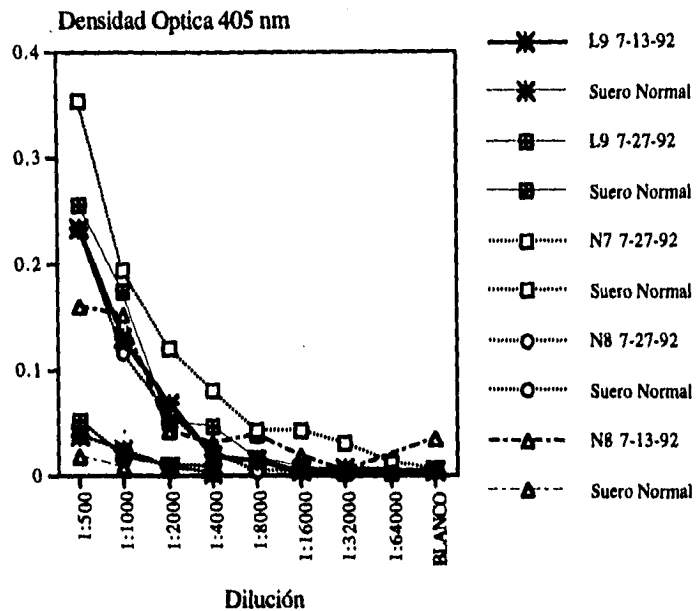
Gráfica 3: ELISA indirecta en células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones BALB-C fueron inmunizados con 100 μ g de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



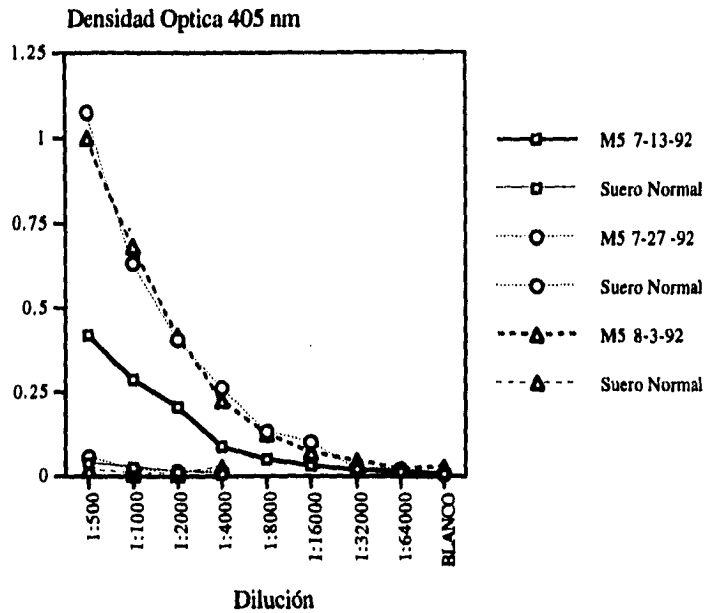
Gráfica 4: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 25 μ g de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



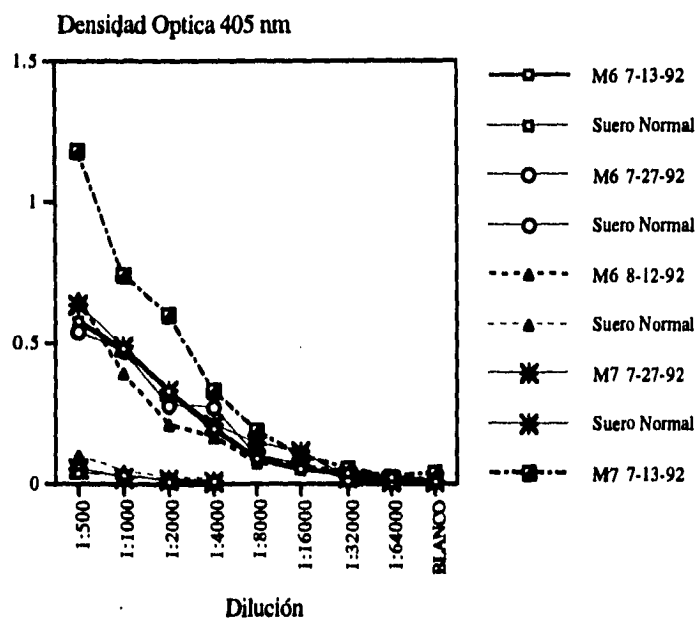
Gráfica 5: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 50 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



Gráfica 6: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 50 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



Gráfica 7: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.



Gráfica 8: ELISA indirecta de extractos de células C6/36 provenientes de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los ratones C57BL/6 fueron inmunizados con 100 µg de intestino medio de *Ae. aegypti*. En la grafica se representa la clave de cada suero de ratón.

Identificación de polipéptidos de extractos de células C6/36 por Inmunoelectrotransferencia con anticuerpos policlonales de ratón anti-Intestino de *Ae.aegypti*.

En la figura 2 se muestra el perfil electroforético de los extractos totales de las células C6/36 en donde se observa un patrón regular de separación de las proteínas en cada una de las concentraciones de proteína agregadas en los distintos carriles (5, 10 y 15 µg).

Los anticuerpos dirigidos contra porciones de matriz peritrófica resultado de la inmunización con 100 µg de proteína reconocen desde 1 hasta 5 polipéptidos de antígenos crudos de células C6/36 lisadas con una masa molecular de 16 a 143 kDa (Tablas 3 y 4; figura 4, tira 1 y figura 5 tiras 1 y 2).

Con anticuerpos generados a partir de inmunizaciones con 25 µg de proteína de intestino medio se obtiene que el grado de reconocimiento de la colección de anticuerpos abarca desde 1 a 5 polipéptidos con una masa molecular de 13 a 195 kDa con preferencia en moléculas de tamaño grande; y donde se observan antígenos reconocidos de manera común: 195 kDa (3 antisueros), 184 kDa (5 antisueros), 143 (2 antisueros) y 46 (2 antisueros).

Estos últimos fueron los más reactivos visualmente. El resto de los polipéptidos fueron de reconocimiento ligero : 79, 16, 39, 31, 50, 34, 147, 128, 49, 161, 75 y 13 kDa (Tabla 4).

El reconocimiento en extractos de células C6/36 con anticuerpos policlonales obtenidos mediante inmunizaciones con 50 µg de proteína de intestino medio fue de 2 a 8 polipéptidos por cada suero con un intervalo de 11 a 170 kDa. El tamaño de las moléculas mas frecuentemente reconocidas fueron de péptidos de masa intermedia seguida de péptidos de tamaño grande y finalmente péptidos chicos (Tabla 4, figuras 3, 4, 5, 6 y 7).

Se reconocieron de una forma más común y frecuente las siguientes moléculas: 184 kDa (5 antisueros), 161 kDa (2 antisueros), 170 kDa (2 antisueros), 143 kDa (3 antisueros), 126 kDa (2 antisueros), 73 kDa (2 antisueros), 61 kDa (4 antisueros), 68 kDa (2 antisueros), 47 kDa (2 antisueros), 37 kDa (3 antisueros), 34 kDa (2 antisueros), 33 kDa (2 antisueros), 29 kDa (3 antisueros), 25 kDa (3 antisueros), 13 kDa (4 antisueros), 14 kDa (2 antisueros) y 16 kDa (2 antisueros).

Antisueros provenientes de ratones inmunizados con 100 μ g de proteína de intestino medio reconocen de 1 a 9 polipéptidos por suero con un intervalo de masa molecular de 11 a 233 kDa.

Los polipéptidos más comúnmente reconocidos son los siguientes (Tabla 3 y 4, figuras 3, 4, 5, 6 y 7): 143 kDa (9 antisueros), 184 kDa (5 antisueros), 126 kDa (5 antisueros), 147 kDa (2 antisueros), 73 kDa (7 antisueros), 79 kDa (2 antisueros), 68 kDa (3 antisueros), 61 kDa (8 antisueros), 52 kDa (2 antisueros), 47 kDa (2 antisueros), 46 kDa (2 antisueros), 35 kDa (3 antisueros), 34 kDa (3 antisueros), 27 kDa (3 antisueros), 29 kDa (3 antisueros), 19 kDa (5 antisueros), 16 kDa (6 antisueros), 11 kDa (2 antisueros) y 13 kDa (2 antisueros).

De manera general los antígenos más frecuentemente reconocidos son los que tienen pesos moleculares aparentes de 184 kDa (15 antisueros), 143 kDa (15 antisueros), 61 kDa (12 antisueros), 13 kDa (11 antisueros), 16 kDa (10 antisueros), 73 kDa (9 antisueros) y 126 kDa (8 antisueros).

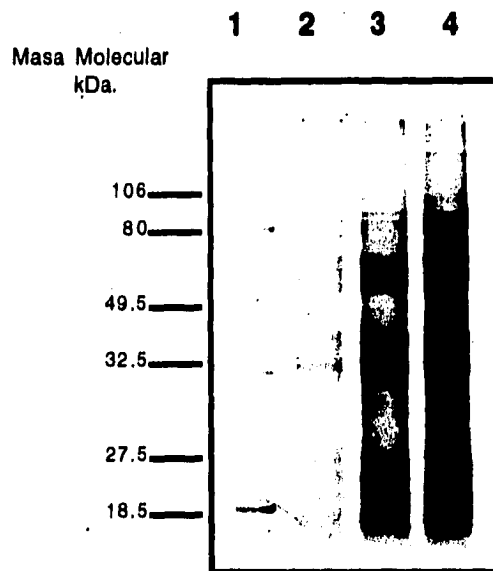


Figura 2: Preparaciones de extractos de células C6/36 fraccionadas por electroforesis de proteínas en geles teñidos con azul de Coomassie.

- 1: Marcadores de masa molecular.**
- 2: 5 µg de lisado de células C6/36.**
- 3: 10 µg de lisado de células C6/36.**
- 4: 15 µg de lisado de células C6/36.**

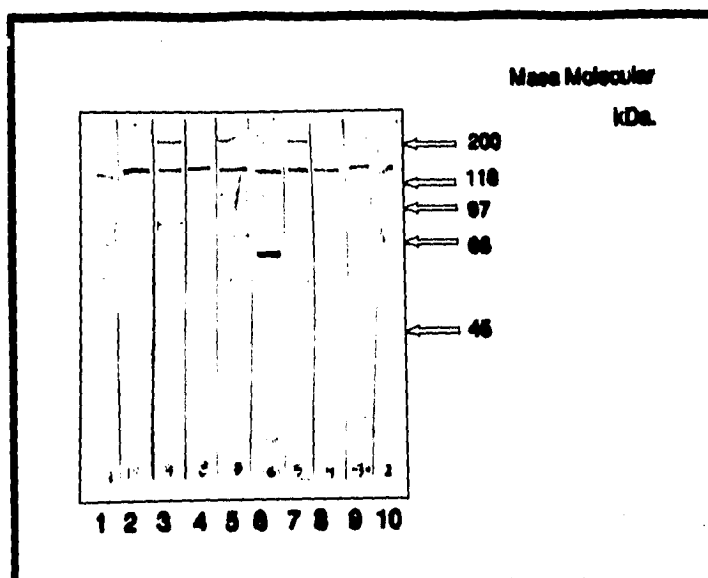


Figura 3: Inmunoelectrotransferencia de extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los anticuerpos fueron el resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 μg de antígeno.

- 1: Suero Normal.
- 2: Blanco.
- 3: Anti-membrana C6/36.
- 4: N7 8-12-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 5: M6 8-12-92 (100 μg , C57BL/6).
- 6: L7 8-12-92 (50 μg , C57BL/6).
- 7: L6 8-12-92 (50 μg , C57BL/6).
- 8: K8 8-12-92 (25 μg , C57BL/6).
- 9: K7 8-12-92 (25 μg , C57BL/6).
- 10: K5 8-12-92 (25 μg , C57BL/6).

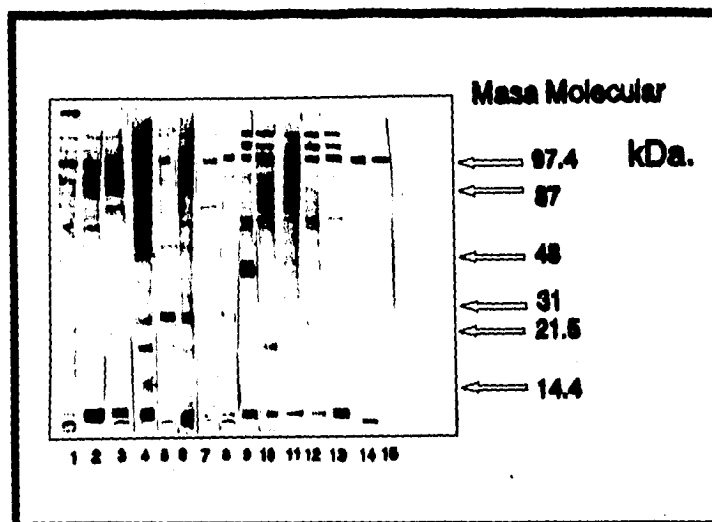


Figura 4: Inmunoelectrotransferencia de extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti* (excepto en la tira 1 donde el anticuerpo fué dirigido contra matriz peritrófica). Los anticuerpos fueron el resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 μg de antígeno.

- 1: E1 6-15-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 2: C4 6-15-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 3: C5 6-15-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 4: C6 6-15-92. (100 μg , cepa BALB-C).
- 5: D7 6-15-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 6: CD 7-20-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 7: K7 6-29-92 (25 μg , cepa C57BL/6).
- 8: D8 6-15-92 (100 μg , cepa C57BL/6).
- 9: M5 7-27-92 (100 μg , cepa C57BL/6).
- 10: M6 7-27-92 (100 μg , cepa C57BL/6).
- 12: L6 7-27-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 13: L9 7-27-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 14: Suero Normal
- 15: Blanco.

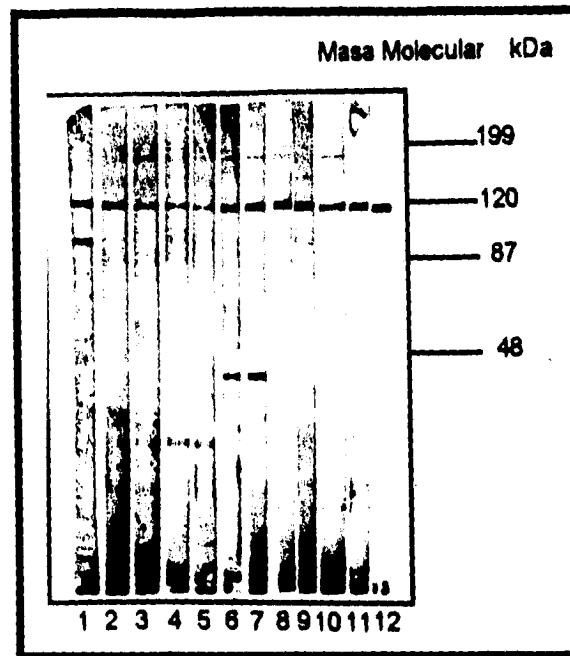


Figura 5: Inmunoelctrotransferencia de extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti* (excepto en la tira 1 y 2 donde los anticuerpos fueron dirigidos contra matriz peritrófica). Los anticuerpos fueron el resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 μg de antígeno.

- 1: E2 6-1-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 2: E3 6-1-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 3: D9 6-15-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 4: CD 7-20-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 5: CD 7-27-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 6: K5 7-27-92 (25 μg , cepa C57BL/6).
- 7: K7 7-27-92 (25 μg , cepa C57BL/6).
- 8: K8 7-27-92 (25 μg , cepa C57BL/6).
- 9: N7 7-27-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 10: N8 7-27-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 11: Suero Normal
- 12: Blanco.

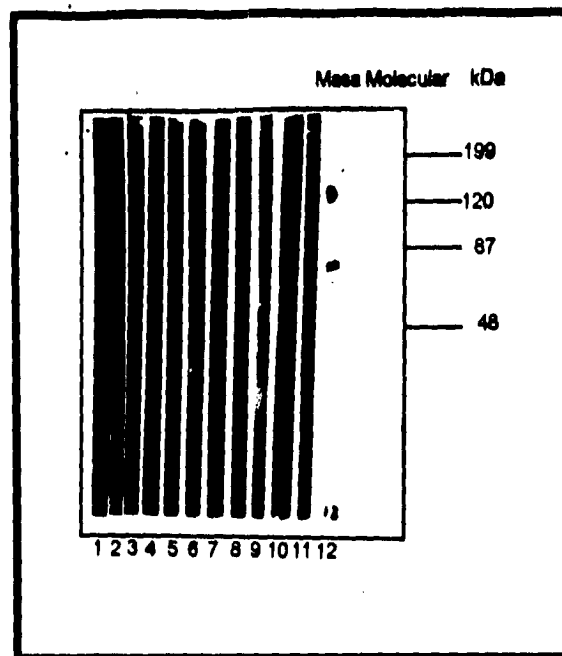


Figura 6: Inmunoelctrotransferencia de extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los anticuerpos fueron el resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 μg de antígeno.

- 1: K7 7-13-92 (25 μg , cepa C57BL/6).
- 2: K8 7-13-92 (25 μg , cepa C57BL/6).
- 3: L6 7-13-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 4: L7 7-13-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 5: L9 7-13-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 6: M5 7-13-92 (100 μg , cepa C57BL/6).
- 7: M6 7-13-92 (100 μg , cepa C57BL/6).
- 8: M7 7-13-92 (100 μg , cepa C57BL/6).
- 9: N5 7-13-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 10: N8 7-27-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 11: Suero Normal
- 12: Blanco.

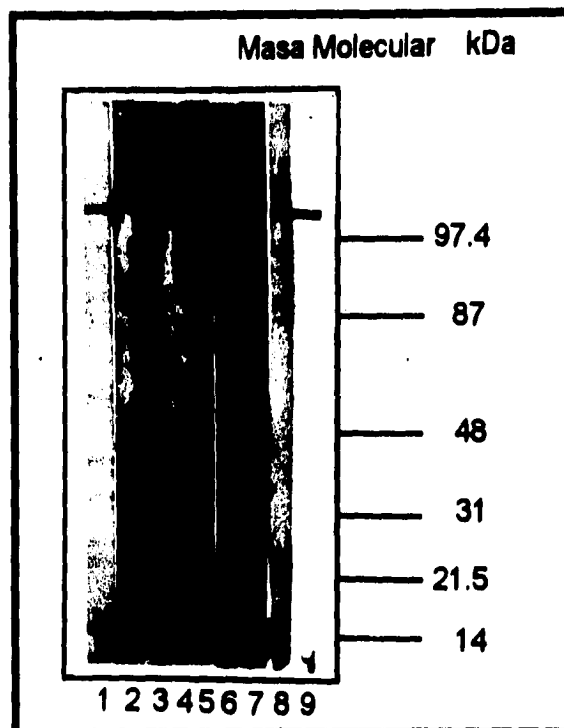


Figura 7: Inmunoelctrotransferencia de extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* con anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti*. Los anticuerpos fueron el resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 μg de antígeno.

- 1: N8 7-13-92 (50 μg , cepa C57BL/6).
- 2: D9 7-3-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 3: K5 8-3-92 (25 μg , C57BL/6).
- 4: M5 8-3-92 (100 μg , C57BL/6).
- 5: C4 8-3-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 6: C6 8-13-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 7: D7 8-13-92 (100 μg , cepa BALB-C).
- 8: Sueo Normal
- 9: Blanco.

Evaluación por Inmunofluorescencia Indirecta de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti* sobre células C6/36 de *Ae. albopictus*.

Los resultados de inmunofluorescencia muestran que existe un reconocimiento de los anticuerpos anti-intestino de mosquito sobre células C6/36 en citoplasma y membrana con grados de especificidad e intensidad diferentes para toda la colección de anticuerpos.

En la figura 8 se muestra los controles del ensayo que corresponden a la apariencia de las células normales y a la inmunofluorescencia empleando suero normal de ratón.

Con los anticuerpos generados a partir de inmunizaciones con 100 μg de proteína de intestino medio se observa reconocimiento en toda la célula, de manera intensa en regiones de membrana (Tabla 3 y 4, figuras 9, 10, 11, 15 y 16).

Con los anticuerpos de ratones inmunizados con 50 μg de proteína de intestino medio dirigidos contra porciones de intestino medio del artrópodo reconocen citoplasma, membrana y toda la célula débilmente (Tabla 4, figura 14).

Los anticuerpos resultado de las inmunizaciones con 25 μg de proteína de intestino medio reconocen específicamente membrana, citoplasma de manera ligera y toda la célula (Tabla 4, figuras 12 Y 13).

Por otra parte en células no permeabilizadas se observó un reconocimiento en membrana tanto para sueros individuales donde se reconocen puntos en la membrana ó la membrana débilmente . Utilizando mezclas de anticuerpos (figura 17) en células no permeabilizadas que abarcan unos conjuntos de sueros positivos reconocen membrana de manera ligera a intensa.

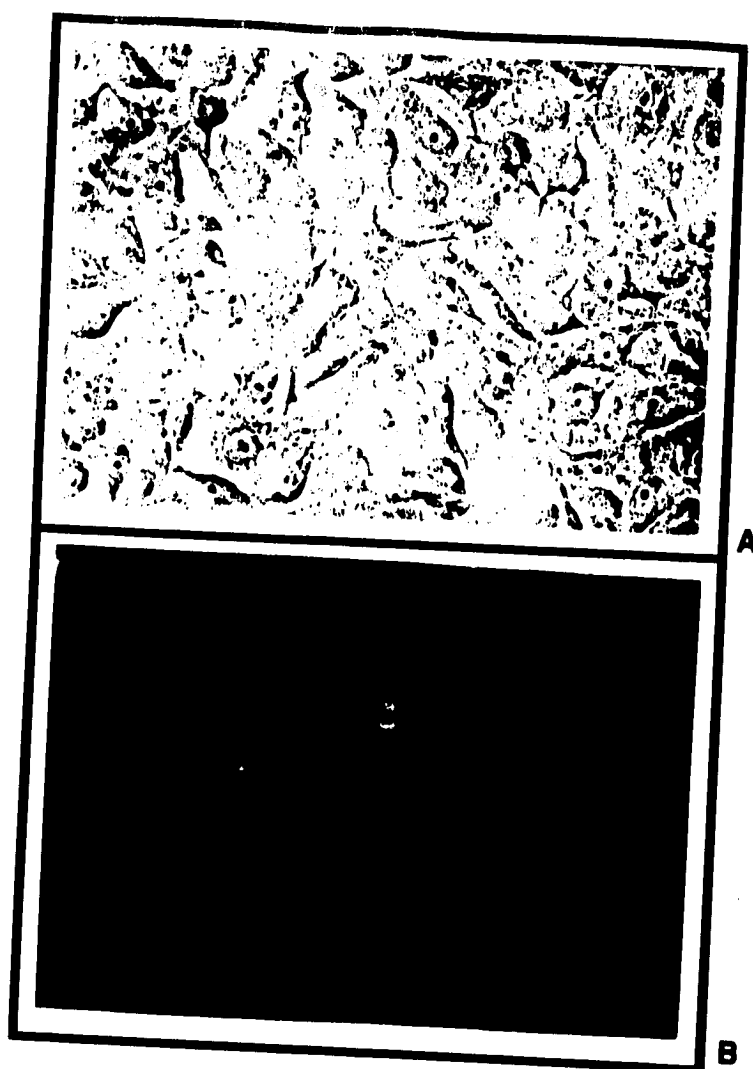


Figura 8: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón inmunizado con adjuvante
A: Aspecto de un cultivo de la clona C6/36 de *Ae. albopictus*.
B: Suero de ratón inmunizado con adjuvante (cepa BALB-C).

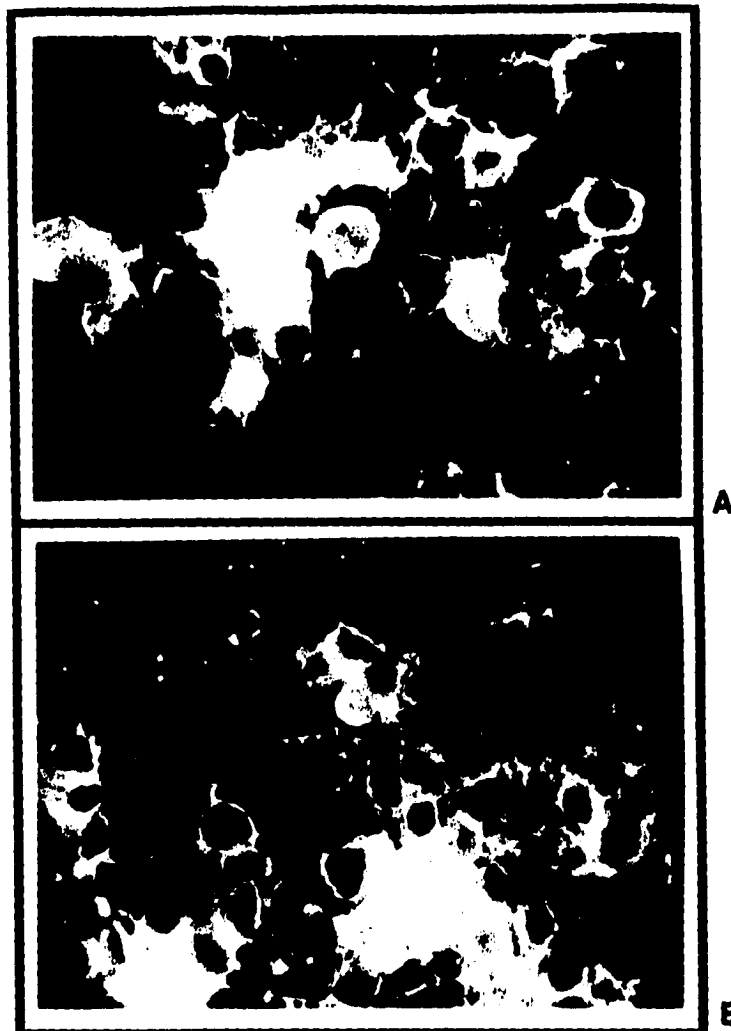


Figura 9: Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa BALB-C inmunizado con 100 μ g de intestino medio de *Aedes aegypti*.

A: SUERO C4 8-13-92.

B: SUERO C6 8-13-92.

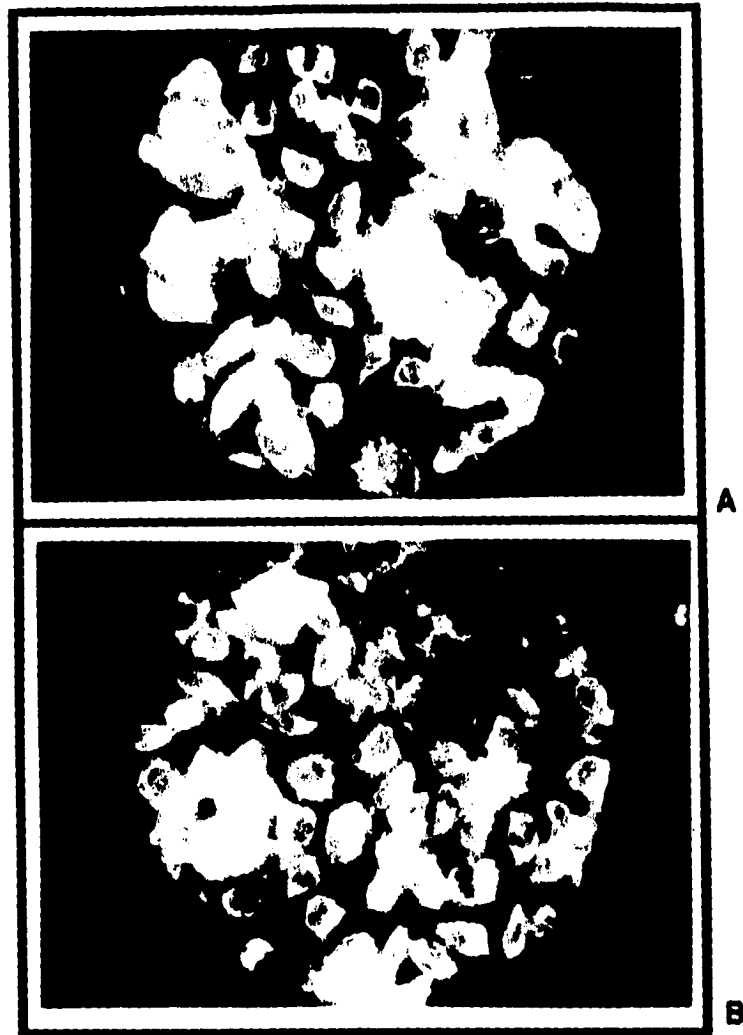


Figura 10: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa BALB-C inmunizado con 100 μ g de intestino medio de *Aedes aegypti*.

A: SUERO C5 6-15-92.

B: SUERO D7 8-13-92.

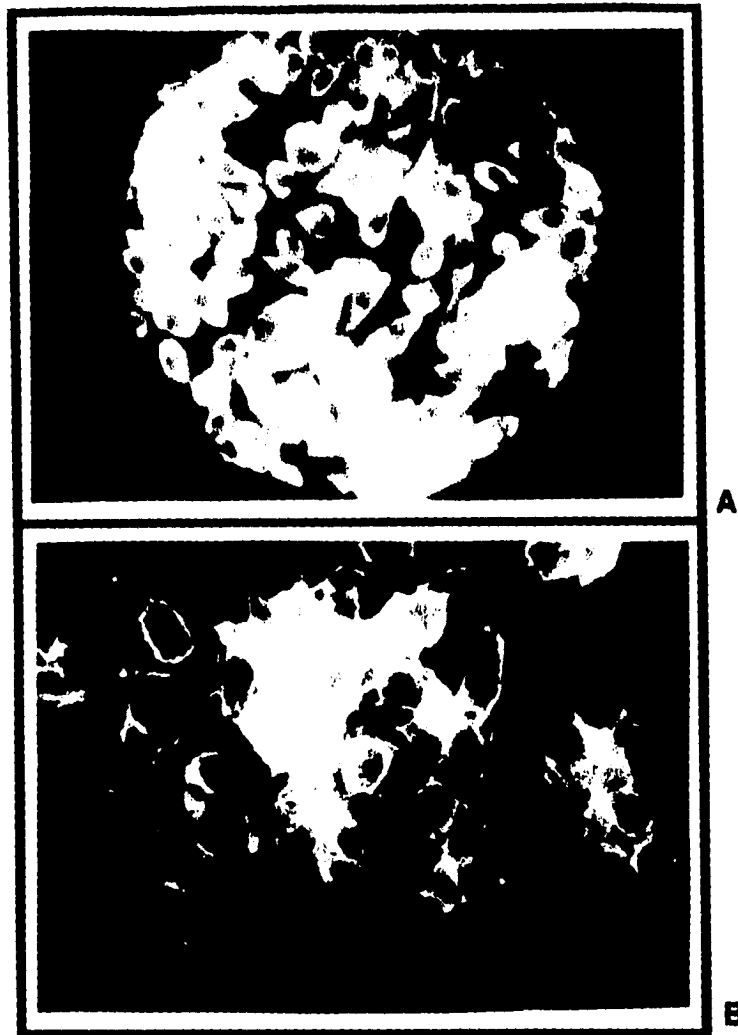


Figura 11: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa BALB-C inmunizado con 100 μ g de intestino medio de *Aedes aegypti*.
A: SUERO D8 6-15-92.
B: SUERO D9 8-3-92.



Figura 12: Inmunofluoresencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa C57BL/6 inmunizado con 25 μ g de intestino medio de *Aedes aegypti*.

A: SUERO K5 7-27-92.

B: SUERO K5 8-12-92.



Figura 13: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa C57BL/6 inmunizado con 25 μ g de intestino medio de *Aedes aegypti*.

A: SUERO K7 8-12-92.

B: SUERO K8 8-12-92.

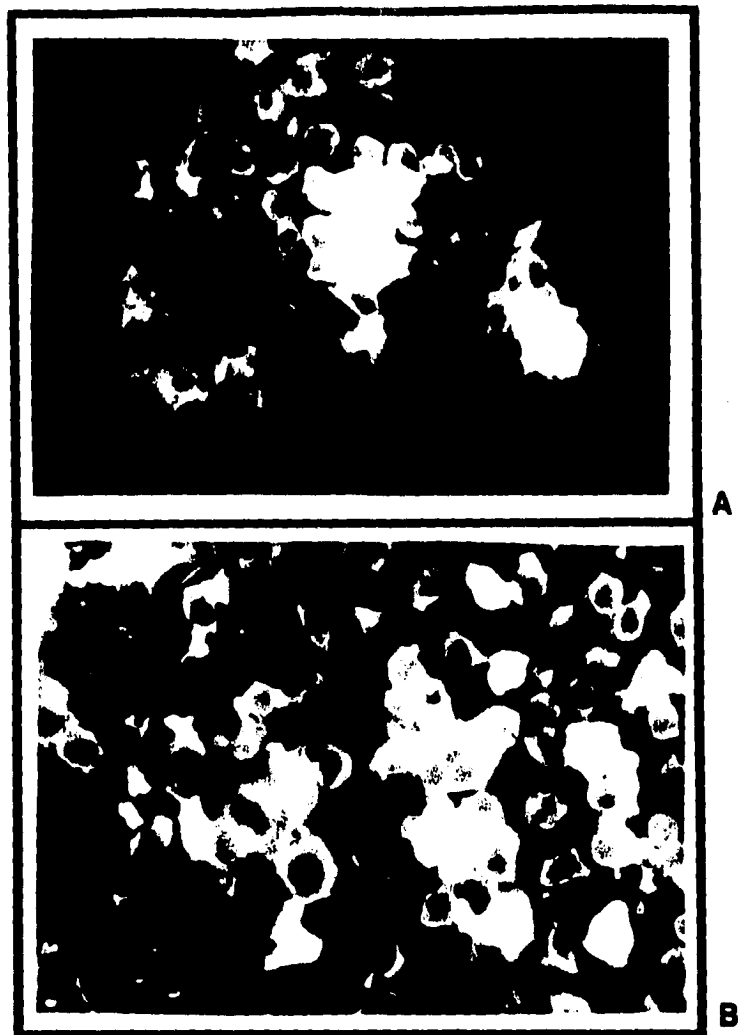


Figura 14: Inmunofluorescencia indirecta en células C6/36 con suero de ratón cepa C57BL/6 inmunizado con 50 μg de intestino medio de *Aedes aegypti*.
A: SUERO L6 8-12-92.
B: SUERO L9 7-13-92.



Figura 15: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa C57BL/6 inmunizado con 100 μ g de Intestino medio de *Aedes aegypti*.
A: SUERO M5 8-3-92.
B: SUERO M6 8-12-92.

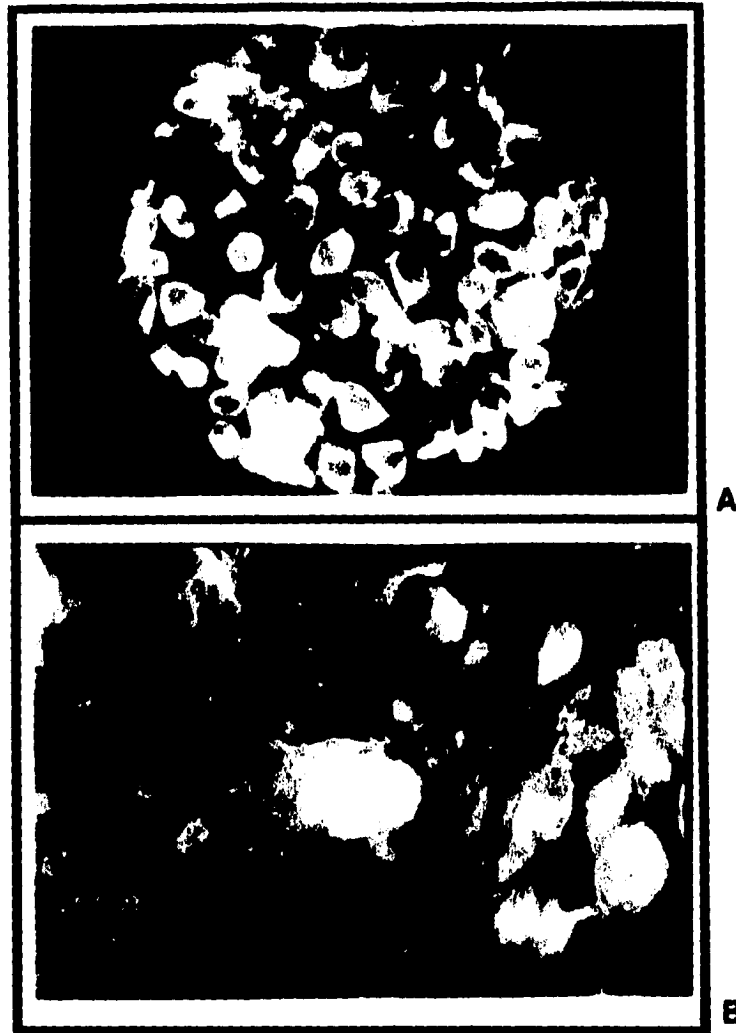


Figura 16: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 con suero de ratón cepa C57BL/6 inmunizado con 100 μ g de intestino medio de *Aedes aegypti*.
A: SUERO M6 7-13-92.
B: SUERO M7 7-27-92.



Figura 17: Inmunofluorescencia indirecta de células C6/36 no permeabilizadas empleando una mezcla de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Aedes aegypti*. La mezcla se hizo con ratones de la cepa C57BL/6 inmunizados con 25, 50 y 100 μg de intestino medio en partes iguales.

Ensayo de unión del virus del Dengue Serotipo 2 con proteínas de células C6/36.

En el ensayo de unión viral se observa que el virus del Dengue serotipo 2 se une de manera específica a polipéptidos con una masa molecular alrededor de 165, 116, 83, 70, 63, 54, 30 y 13 kDa utilizando virus purificado acoplado a biotina (figura 18).

Por otra parte 14 anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino de *Ae. aegypti* reconocen una serie de péptidos con un tamaño cercano a las bandas virales específicas (29, 13, 71, 31 y 162 kDa) que debido a la incertidumbre en la resolución con los marcadores de masa molecular corresponderían a las moléculas candidatas de células C6/36 reconocidas por el virus.

Del total de los 15 antisueros 14 corresponden a anticuerpos anti-intestino medio y 1 a un antisuero dirigido contra la matriz peritrófica del mosquito. Todos estos antisueros fueron resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 µg de proteína de intestino del vector.

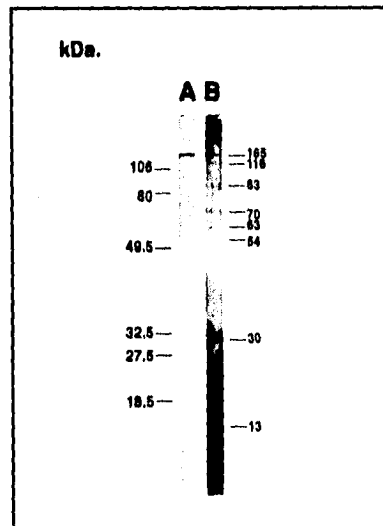


Figura 18: Ensayo de unión del virus del dengue serotipo 2 a proteínas de células C6/36 electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa.

- A)** Control (solución amortiguadora TBS)
B) Virus dengue 2 diluido 1:100 en solución TBS.

Tabla 3 : Evaluación inmunoquímica de anticuerpos policlonales de ratón (cepa BALB-C) anti-intestino medio de *Ae.aegypti* en células C6/36.

Clave de suero por ratón	Cantidad de proteína (µg)	Título por ELISA sobre células C6/36 de <i>Ae. albopictus</i> .	Título por ELISA sobre intestino medio de <i>Ae.aegypti</i> .	Polipéptidos reconocidos por Inmunoelotransferencia sobre células C6/36 . Masa Molecular kDa.	Reconocimiento por Inmunofluorescencia indirecta en células C6/36.		
					M	C	T
C4 6-15-92	100	1:64 000	1:256 000	143 126 73 16			
C4 8-13-92	100	1:8 000	1:512 000	147 19	++		
C5 6-15-92	100	1:32 000	1:512 000	79 35 16			++
C8 6-15-92	100	1:64 000	1:1024 000	143 126 101 79 73 68		+	
C8 8-13-92	100	1:16 000	1:512 000	77 25	++		
D7 6-15-92	100	1:32 000	1:128 000	150 143 61 35 27			
D7 8-13-92	100	1:64 000	1:1024 000	162 73 19	++		
D8 8-15-92	100	1:1 000	1:128 000	143 16			++
D9 8-15-92	100	1:18 000	1:128 000	207 184 46 36 32 29	+	+	
				21			
D9 8-3-92	100	1:64 000	1:256 000	19	+++	+	
CD 7-20-92	100	1:4 000	1:128 000	143 73 61 35 27 18	++		
CD 7-27-92	100	1:8 000	1:128 000	195 184 29			
E1 6-1-92	100 m.p	-	-	143 126 16			
E2 6-1-92	100 m.p	-	-	108			
E3 6-1-92	100 m.p.	-	-	46 36 32 29 21			
A1 8-13-92	-	-	-				
A3 8-13-92	-	-	-				
B1 8-13-92	-	-	-				
B2 8-13-92	-	-	-				
B3 8-13-92	-	-	-				

M membrana, C citoplasma, T toda la célula, +++ fuerte, ++ moderado, + débil y m.p matriz peritrofica.

Tabla 4 : Evaluación inmunoquímica de anticuerpos policlonales de ratón (cepa C57BL/6) anti-intestino medio de *Ae.aegypti* en células C6/36.

Clave de suero por ratón	Cantidad de proteína (µg)	Título por ELISA sobre células C6/36 de <i>Ae. albopictus</i> .	Título por ELISA sobre intestino medio de <i>Ae.aegypti</i> .	Polipéptidos reconocidos por inmunoelectrotransferencia sobre células C6/36 . Masa Molecular kDa.	Reconocimiento por inmunofluorescencia indirecta en células C6/36.		
					M	C	T
K5 7-27-92	25	1:1 000	1:1024 000	195 164 46 39 31			++
K5 8-3-92	25	1:2 000	1:1024 000	147 126	+	+	
K5 8-12-92	25		1:1024 000	49			
K7 6-29-92	25	-	1:64 000	143 79 16			
K7 7-13-92	25		1:1024 000	164	++	++	
K7 7-27-92	25	1:4 000	1:1024 000	195 164 50 46 34	+		
K7 8-12-92	25	1:16 000	1:1024 000	161 143 75 13		++	
K8 7-13-92	25	-	1:8 000	164			
K8 7-27-92	25	-	1:32 000	195 184			
K8 8-12-92	25	1:4 000	1:8 000	-			++
L6 7-13-92	50	1:16 000	1:128 000	184 14 13			
L6 7-27-92	50	1:2 00	1:256 000	143 126 73 68 61 27 16			
L6 8-12-92	50	1:32 000	1:512 000	170 161 143 49 29 25 13	+	+++	
L7 7-13-92	50	1:32 000	1:512 000	164 61 14 13		++	
L7 8-12-92	50	1:8 000	1:1024 000	170 161 106 68 29 25 17 13	++	++	
L9 7-13-92	50	1:8 000	1:256 000	184 61 47 42 36 34 11	+++		
L9 7-27-92	50	1:16 000	1:256 000	143 126 73 16			
J2 6-29-92	-	-	-				
J1 7-27-92	-	-	-				
J3 7-27-92	-	-	-				
J4 6-12-92	-	-	-				

M membrana, C citoplasma, T toda la célula, +++ fuerte, ++ moderado y + débil.

Clave de suero por ratón	Cantidad de proteína (µg)	Título por ELISA sobre células C6/36 de <i>Ae. albopictus</i> .	Título por ELISA sobre intestino medio de <i>Ae. aegypti</i> .	Polipéptidos reconocidos por inmunoelectrotransferencia sobre células C6/36 . Masa Molecular kDa.	Reconocimiento por inmunofluorescencia indirecta en células C6/36.		
					M	C	T
M5 7-13-92	100	1:64 000	1:512 000	184 61 42 34 14 13 11			
M5 7-27-92	100	1:64 000	1:512 000	143 126 73 66 61 52 16		++	
M5 6-3-92	100	1:32 000	1:512 000	147 126 47 19			++
M6 7-13-92	100	1:64 000	1:512 000	231 184 71 61 48 46 34 19 11	++		
M6 7-27-92	100	1:32 000	1:256 000	143 126 73 66 61 27 16			++
M6 8-12-92	100	1:6 000	1:256 000	161 143 75 49 39 29 25 13	+	+	
M7 7-13-92	100	1:32 000	1:256 000	233 164 61 47 34 20		++	
M7 7-27-92	100	1:64 000	1:512 000	143 126 73 52	++		
N5 7-13-92	50	-	1:32 000	184 37			
N7 7-13-92	50	-	1:64 000	34 31			
N7 7-27-92	50	1:64 000	1:512 000	.			+
N7 8-12-92	50	-	1:64 000	29 25			+
N8 7-13-92	50	1:2 000	1:64 000	54 52 39 37 33 19			
N8 7-27-92	50	1:4 000	1:512 000	184 61 47 37 33 26			
N8 6-12-92	50	-	1:64 000				

M membrana, C citoplasma, T toda la célula, +++ fuerte, ++ moderado y + débil.

DISCUSION.

La inmunidad anti-vector generada en vertebrados mamíferos por medio de inmunizaciones artificiales utilizando tejidos de artrópodo altera la dinámica de la transmisión del virus y los parásitos a través de mecanismos tales como la reducción en la viabilidad y fecundidad de los vectores, perturbación en sus conductas alimentarias, daño tisular (principalmente en el intestino) y alteraciones en la fisiología del desarrollo y propagación del patógeno dentro de los órganos del vector.

Esta inmunidad generada en mamíferos de manera natural durante la infestación (resistencia adquirida) ó artificial (inmunizaciones artificiales) es originada por antígenos específicos de los artrópodos derivados de la saliva, glándulas salivales, tejidos abdominales, torácicos, intestino, primordios alares, tejidos totales etc. Hasta ahora la mayor parte de estos antígenos han sido caracterizados a partir de la saliva y glándulas salivales de garrapatas y en menor cantidad de mosquitos (48).

Una gran cantidad de polipéptidos de glándulas salivales evaluadas por inmunoelectrotransferencia con antisueros de conejos infestados con *Hyalomma anatolicum anatolicum* fueron reactivos en un número de 9 a 17 moléculas con un tamaño determinado por electroforesis SDS-PAGE de 14.4 a 130 kDa (49).

Muy recientemente en este campo se han hecho experimentos utilizando antígenos no salivales como los originados en **intestino** de garrapatas y mosquitos que en condiciones naturales muy ocasionalmente son introducidos en el hospedero vertebrado durante la alimentación del vector, los anticuerpos generados contra estos antígenos nuevos provocan daños más notables en el intestino del vector y alteraciones fisiológicas de la interacción patógeno-intestino. Estos efectos son provocados por el reconocimiento en altos títulos a epítomos específicos del epitelio intestinal del invertebrado.

Anticuerpos de ratón en altos títulos dirigidos contra antígenos derivados de cabeza/tórax, intestino medio o abdomen de *Anopheles tessellatus* reducen su fecundidad arriba del 29% postulándose que estos anticuerpos reaccionan con antígenos de estos tejidos implicados directamente en la reducción de la fecundidad (50). En el caso de los

mosquitos culicidos la existencia de anticuerpos anti-vector en el alimento sanguíneo del artrópodo reduce la fecundidad y aumenta la mortalidad de *Aedes aegypti* (51, 52).

En este estudio se observó que de un total de 47 antisueros policlonales de ratón anti-intestino medio de *Aedes aegypti* resultado de la inmunización con 25, 50 y 100 μg de proteína evaluados inmunológicamente en células C6/36 originadas a partir de larvas de *Aedes albopictus* muestran **reactividad cruzada** (tabla 3 y 4) en la que ciertos determinantes antigénicos de *Ae. aegypti* reconocidos con títulos altos en extractos de intestino medio son reconocidos también en títulos positivos aunque inferiores en células de *Ae. albopictus* indicando que algunas moléculas del intestino y de la estirpe celular C6/36 están relacionadas y son compartidas por los dos insectos.

La reactividad de los antisueros anti-intestino tiene una relación proporcional en cuanto a la cantidad de inmunógeno inyectado, con cantidades menores de intestino (25 μg de intestino) la reactividad en células C6/36 e intestino tuvo los títulos menores comparados con los sueros de ratones inmunizados con 50 y 100 μg de proteína que presentaron títulos muy altos (tabla 3 y 4). Este reconocimiento proporcional revela que la abundancia de los antígenos reconocidos de intestino medio aumenta conforme se adiciona más cantidad de inmunógeno; es decir en concentraciones más altas de antígeno la capacidad de generar respuesta humoral de los ratones es más amplia ya que aumenta la cantidad de epítomos posibles del intestino del vector. Aunque es importante notar que los antisueros de ratones inmunizados con 25 μg de antígeno reconocieron preferencialmente membrana plasmática y los sueros de ratones inmunizados con 50 a 100 μg algunos de ellos reconocieron aparentemente estructuras internas de las células.

Una cantidad importante de epítomos de intestino medio se encuentran en células larvales de *Ae. albopictus* en una concentración inferior lo que indica la existencia de dominios en los polipéptidos de ambos insectos que muy seguramente podrían participar como moléculas responsables de generar inmunidad anti-vector en los ratones artificialmente inmunizados.

Por pruebas de inmunoelectrotransferencia se encontró que los anticuerpos reaccionan primordialmente con moléculas de masa molecular alta en células C6/36 debido a que un polipéptido grande contiene más epítomos que son reconocidos, no obstante al aumentar la cantidad de antígeno inmunizado se generan anticuerpos que reaccionan con más

proteínas incluyendo aquellas de tamaño medio y bajo, además de las de masa molecular alta.

Los ratones al ser inmunizados con intestinos de moscos alimentados sin sangre pero con una solución azucarada implica que la respuesta inmune del ratón se dirige contra antígenos más específicos de la capa epitelial del vector y no contra otros posibles inmunógenos como los componentes de la matriz peritrófica (cuya síntesis es inducida por la ingestión de sangre), células sanguíneas, componentes de la digestión, enzimas inducidas etc. Estos antígenos reconocidos por los anticuerpos son en buena medida componentes de la superficie celular por lo que es de esperarse una reactividad importante contra estos sitios en el intestino.

En este trabajo mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta se observó que el reconocimiento de estos antisueros en células de *Ae. albopictus* fue en zonas importantes como la membrana, regiones internas del citoplasma y en algunos casos toda la célula. Esto se reflejó en el reconocimiento de antígenos de alto, intermedio y baja masa molecular. Con estos resultados podríamos sugerir que algunos de los componentes que se encuentran en la arquitectura de las **células larvales** de *Ae. albopictus* y de las **células epiteliales** del intestino medio de *Ae. aegypti* son compartidos. Así mismo nos sugiere que tienen características comunes que se podrían relacionar con los eventos de unión, penetración e internalización del virus Dengue serotipo 2 en condiciones *in vitro* (modelo de células larvales C6/36) e *in vivo* (intestino medio de *Ae. aegypti*).

El mecanismo de entrada de flavivirus es complejo y poco entendido, en células de mamífero tipo macrófagos como las células P388D1 de ratón la **fusión con membrana** es la forma de entrada del virus del Oeste del Nilo y depende de un pH ácido. A un pH alcalino la forma predominante es **endocitosis mediada por receptor** utilizando concentraciones subneutralizantes de anticuerpo antiviral que provocan un incremento en la cantidad de partículas virales que se unen a la superficie celular con el receptor para Fc permitiendo la internalización más eficiente de los complejos anticuerpo-virus (53, 54).

El virus de la encefalitis japonesa penetra y se multiplica en células híbridas derivadas de células neurogénicas de ratón indicando que en las infecciones neuromórficas en mamíferos las neuronas del sistema nervioso central expresan receptores de superficie específicos a flavivirus, de esta manera los viriones **penetran directamente la membrana plasmática** de

las células híbridas (55).

Se ha observado por microscopía electrónica de transmisión que el virus Dengue 2 cepa PR-159 y el virus de la encefalitis japonesa cepa SA14 entra a células C6/36 por **fusión con la membrana plasmática** que se absorben las proyecciones de superficie viral (glucoproteína E), se disuelve la membrana plasmática en los sitios de absorción y el virión penetra en el citoplasma a través de perturbaciones creadas en la membrana, después la membrana se repara y el virus ya no se observa dentro de la célula ya que éste se disuelve.

Algo similar se encontró en monocitos humanos, con esto se evita la activación de reacciones inmunes resultado de la endocitosis de moléculas extrañas (56).

La **fusión externa (FFWO)** de las células C6/36 asociada a la entrada de flavivirus durante la infección en estas, es dependiente de un pH ácido y se ha caracterizado para los serotipos del Dengue (1, 2, 3 y 4), el virus de la fiebre amarilla y de la encefalitis japonesa utilizando altas multiplicidades de infección. Basados en estos estudios se ha postulado que el pH ácido activa un **cambio conformacional** en la glucoproteína E de la envoltura del virus con lo cual este se fusiona a la membrana celular. Al parecer el virus Dengue y otros flavivirus poseen la actividad de fusión de membranas asociada directamente a la entrada viral y estimulada por factores ambientales (57).

En investigaciones recientes respecto a la forma de penetración del virus del dengue serotipo 2 en células C6/36 se encontró la ausencia de receptores Fc en estas células lo que implica que la forma de entrada podría ser muy distinta a la que implique la participación del receptor Fc en la internalización de complejos virus-anticuerpo en macrófagos en infecciones utilizando concentraciones subneutralizantes de anticuerpos contra el Dengue (58).

Un receptor celular al virus del de se desconoce hasta la fecha.

En macrófagos se ha sugerido que el virus entra por la unión a anticuerpos específicos por el receptor Fc.

En este trabajo se identificaron polipéptidos que interactúan con el virus del dengue 2 utilizando extractos de células C6/36 con una masa molecular de 165, 116, 83, 70, 63, 54, 30 y 13 kDa. Basados en estos antecedentes consideramos que es de suma importancia definir posibles

receptores en células de mosquitos. Mediante investigaciones con receptores a arbovirus en células de mosquito se conoce que el alfavirus de la encefalitis equina venezolana se une a un polipéptido de 32 kDa de las membranas plasmáticas de células C6/36 de una manera dosis dependiente, saturable y a través de una interacción ligando- receptor. El polipéptido es un receptor de alta afinidad a laminina y se ha encontrado en el epitelio del intestino medio de mosquitos vectores (59).

De la colección de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae.aegypti* evaluados en células C6/36, 15 de los 47 sueros positivos reconocen por inmunoelectrotransferencia polipeptidos cercanos a las moléculas que interactúan con el virus.

Los títulos de estos 15 anticuerpos generados a partir de inmunizaciones con 25, 50 y 100 µg de proteína (tabla 3 y 4), en la evaluación por ELISA usando como antígeno intestino medio fueron desde 1:64 000 hasta 1:1024 000 que indica que éstos reconocen muchos antígenos en el intestino del insecto, en células C6/36 la evaluación mostró títulos menores desde 1:1000 hasta 1:64000 específicos por polipéptidos de la clona C6/36 con masas moleculares que variaron entre 13 y 233 kDa.

La mayoría de estos anticuerpos reconocen membrana plasmática, citoplasma o zonas de membrana y otros reconocieron a la célula en total.

La participación de estos anticuerpos como posibles bloqueadores a la infección por el virus dengue reside en la propiedad de impedir la unión de las proteínas virales (PUVs) con los receptores celulares (RC) del epitelio intestinal de *Ae.aegypti* y *Ae.albopictus*.

En células epiteliales del intestino medio de *Ae. aegypti* una mezcla de anticuerpos de conejo anti-vector reduce la susceptibilidad a la infección por flavivirus y alfavirus. Sin embargo, cuando la infección ya se efectuó, no impiden la propagación del virus en el mosquito ni la transmisión a hospederos vertebrados.

Cuando utilizamos la mezcla de anticuerpos anti-intestino medio positivos obtenidos en el laboratorio se encontró un reconocimiento en membrana por ensayos de inmunofluorescencia en células C6/36 (figura 16).

Por lo que utilizando anticuerpos específicos en altos títulos por los receptores en las membranas, probablemente se podría impedir la unión del virión a la superficie celular. Los anticuerpos anti-intestino medio que

obtuvimos reconocen a los polipéptidos de 29, 13, 71, 31 y 162 kDa similar a las proteínas reconocidas por el método de unión viral *in vitro* (overlay) lo que sugeriría que estos anticuerpos podrían impedir la unión del virus a las células y posiblemente bloquear la infección.

Basado en esto último, podríamos sugerir que las células C6/36 podrían ser un sistema que nos ayude a identificar, seleccionar y caracterizar moléculas de células epiteliales las cuales podrían tener epítomos comunes con moléculas del epitelio intestinal de mosquitos reconocidas por el hospedero que genera inmunidad anti-vector contra más de una especie de mosquitos.

Resumiendo, podríamos decir que la estrategia inmunológica para el control del vector nos podría ofrecer como ventaja el poder bloquear la infección de las células del mosquito por los virus patógenos y de esta manera bloquear la transmisión de éstos en eucariontes superiores como el humano.

CONCLUSIONES.

En este trabajo se presenta una evaluación mediante técnicas inmunoquímicas del reconocimiento de una colección de anticuerpos policlonales de ratón anti-intestino medio de *Ae. aegypti* en un sistema de cultivo de células de larvas de mosquitos de *Ae. albopictus* (C6/36).

El resultado más evidente de esta evaluación fue la existencia de una **reactividad cruzada** de los anticuerpos anti-estómago medio de mosquitos y las células C6/36 lo que sugiere que ambos vectores comparten epítopos comunes y probablemente relacionados evolutivamente.

Con técnicas como ELISA, Inmunofluorescencia e Inmuno-electrotransferencia se logró evaluar, identificar y seleccionar de una colección de 47 sueros policlonales de ratones inmunizados con porciones de intestino medio de *Ae. aegypti* con una concentración de proteína de 25, 50 y 100 µg de proteína, 15 que podrían participar en el bloqueo de la infección con el virus del dengue serotipo 2 en células de *Ae. albopictus*.

Para conocer más detenidamente la naturaleza bioquímica de un posible bloqueo se hicieron ensayos de unión *in vitro* del virus del dengue con proteínas de células C6/36 lo que resultó en la identificación de polipéptidos con pesos moleculares aparentes de 165, 116, 83, 70, 63, 54, 30 y 13 kDa que interactúan con el virus del dengue, lo que sugiere que uno de los receptores celulares del vector al virus dengue podría ser una o dos proteínas. Estos 15 antisueros reconocen varios polipéptidos incluyendo aquellos que tendrían una masa molecular similar a las bandas reconocidas por el virus, reconocen a la membrana plasmática y muestran títulos positivos en extractos de células C6/36 de *Ae. albopictus* y de intestino medio de *Ae. aegypti*, donde en este último los títulos son los más altos.

En México el problema de la enfermedad del dengue reside en la posibilidad de expansión de zonas endémicas e hiperendémicas con un aumento en la cantidad de casos de FHD/SChD que se debe a muchos factores tales como: la competencia o capacidad vectorial, la existencia de los cuatro serotipos del virus en especial el serotipo 2 y el ingreso y expansión de un nuevo vector (*Ae. albopictus*).

Este trabajo podría servir como base para caracterizar inmunógenos

derivados de tejidos de mosquitos vectores (intestino medio) que podrían ser utilizados para generar inmunidad anti-vector en vertebrados y ganado mediante inmunizaciones que reduzcan las poblaciones de vectores y al mismo tiempo la transmisión del Dengue es decir un probable Control Inmunológico.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Gómez-Dantés, H. *et al.* 1993. Monografía sobre la Epidemiología del Dengue. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud, México.
- 2.- Monath, P.T. 1994. Dengue : The risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academic Science of USA*. 91 : 2395-2400.
- 3.- Ludwig, V.G. and Iacono-Connors, C.L. 1993. Insect-Transmitted Vertebrate Viruses: Flaviviridae. *In vitro Cellular Developmental Biology*. 29A: 296-309.
- 4.- Halstead, B.S. 1988. Pathogenesis of Dengue : Challenges to Molecular Biology. *Science*. 239: 476-481.
- 5.- Silva, M. 1992. Dengue: Estudio clínico de 50 casos. *PCM Venezuela*. Año 6.Vol 6(1): 9-13.
- 6.- Chambers, J.T. *et al.* 1990. Flavivirus Genome, Organization, Expression and Replication. *Annual Review of Microbiology*. 44: 649-688.
- 7.- O'Patey, L. *et al.* 1993. Unusual Neurologic Manifestations occurring during Dengue Fever Infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 48(6): 793-802.
- 8.- Monath, P.T. Pathobiology of the Flaviviruses. *In* : Schlesinger, S. and Schleisnger, J.M., eds. *The Togaviridae and Flaviviridae*. New York : Plenum Press:1986: 375-424.
- 9.- Bancroft, H.W. *et al.* 1984. Dengue Virus Type 2 Vaccine : Reactogenicity and Immunogenicity in soldiers. *The Journal of Infectious Diseases*. 149(6):1005-1010.
- 10.- Kurane, I. *et al.* 1991. Dengue Virus-Specific, Human CD₄⁺ CD₈⁻ Cytotoxic T-Cell Clones. *Journal of Virology*. 65(4):1823-1828.
- 11.- Halstead, B.S. *et al.* 1980. Enhancement of Dengue Virus Infection in Monocytes by Flavivirus Antisera. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 29(4):638-642.

- 12.- Portefield, S.J. Comparative and Historical Aspects of the Togaviridae and Flaviviridae. In: Schlesinger, S. and Schleisnger, J.M., eds. **The Togaviridae and Flaviviridae**. New York: Plenum Press: 1986:1-19.
- 13.- Leake, J.C. 1992. Arbovirus-Mosquito Interactions and Vector Specificity. *Parasitology Today* . 8(4):123-128.
- 14.- Koblet, H. Invertebrate Cells for Mammalian Virus Research. In : Maramorosch, K. and McIntosh, H.A. eds. **Arthropod Cell Culture Systems**. U.S.A: CRS Press Inc; 1994:112-168.
- 15.- Koblet, H. 1993. Invertebrate Tissue Culture as a Tool to Study Insect-Transmitted Vertebrate Viruses: A Brief Introduction. *In Vitro Cellular Developmental Biology* . 29(A):272-273.
- 16.- Singh, K.R.P. 1967. Cell Cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). *Current Science*. 36:506-508.
- 17.- Igarashi A. 1978. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. *Journal of General Virology*. 40:531-541.
- 18.- Kuno, G. and Oliver, A. 1989. Maintaning Mosquito Cell Lines At High Temperatures: Effects on the Replication of Flavivirus. *In Vitro Cellular Developmental Biology*. 25(2):193-196.
- 19.- Stollar, V. 1987. Aproaches to the Study of Vector Specificity for Arboviruses-Model Systems Using Cultured Mosquito Cells. **Advances In Virus Research**. 33:327-365.
- 20.- Smith, H. Host and Tissue Specificities in Virus Infections of Animals. In : Poste, G. and Nicolson, L.G. eds. Virus Infection and The Cell Surface. **Cell Surface Rewliews**. Vol 2. Elsevier/North-Holland Biomedical Press ; 1977:1-34.
- 21.- Rott, R. and Klenk, D.H. Structure and assembly of viral envelope. In : Poste, G. and Nicolson, L.G. eds. Virus Infection and The Cell Surface. **Cell Surface Rewliews**. Vol 2. Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1977: 47-117.
- 22.- Wickham, J.T. *et al* . 1990. General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Journal of Biophysics*. 58:1501-1516.

- 23.- Marsh, M. and Helenius, A. 1989. Virus Entry into Animal Cells. **Advances in Virus Research.** 36:107-151.
- 24.- Haywood, M.A. 1994. Virus Receptors : Binding, Adhesion Strengthening, and Changes in Viral Structure. **Journal of Virology.** 68(1):1-5.
- 25.- Kielian, M. and Helenius, A. Entry of Alphaviruses. In : Schlesinger, S. and Schleisner, J.M., eds . **The Togaviridae and Flaviviridae.** New York : Plenum Press:1986:91-115.
- 26.- Koblet, H. *et al.* 1990. Fusion of *Aedes albopictus* Cells, Clone C6/36, by Japanese Encephalitis Virus is Triggered by Low pH. **Tropical Medicine.** 32(4):145-154.
- 27.- Hase, T. *et al.* Morphogenesis of Flaviviruses. In: Harris, R.J. ed. **Subcellular Biochemistry.** Virally Infected Cells. Vol 15. New York. Plenum Press: 1989: 275-305.
- 28.- Lehane, J.M. 1991. **Biology of Blood-Sucking Insects.** Harper Collins Academic. London. UK. 280 pp.
- 29.- Villanueva, R.F. 1990. El Dengue. **Ciencia.** 41:45-55.
- 30.- De Foliart, R.G. *et al.* 1987. Advances in Mosquito-Borne Arbovirus/Vector Research. **Annual Review of Entomology.** 32:479-505.
- 31.- Chamberlain, W.R. and Sudia, D.W. 1961. Mechanism of Transmission of Virus by Mosquitoes. **Annual Review of Entomology.** 6:371-390.
- 32.- Ramasamy, R. and Ramasamy, S.M. 1990. The Role of Host Immunity to Arthropod Vectors in Regulating the Transmission of Vector Borne Diseases. **Insect Science Applications.** 11(6): 845-850.
- 33.- Wikel, K.S. 1992. Immunological Strategies for Suppression of Vector Arthropods: Novel Approaches in Vector Control. **Bulletin of the Society of Vector Ecology.** 17(1):10-19.
- 34.- Whelan, Ch.A. and Wikel, K.S. 1993. Acquired Resistance of Guinea Pigs to *Dermacentor andersoni* mediated by Humoral Factors. **Journal of Parasitol.** 79 (6):908-912.

- 35.- Wikel, K.S. 1982. Immune Responses to Arthropods and Their Products. **Annual Review of Entomology**. 27:21-48.
- 36.- Ramachandra, N.R. and Wikel, K.S. 1992. Modulation of Host-Immune Responses by Tick (Acari: Ixodidae); Effect of Salivary Gland Extracts on Host Macrophages and Lymphocyte Cytokine Production. **Journal of Medical Entomology**. 29 (5):818-826.
- 37.- Wikel, K.S. *et al.* 1994. Tick-Induced Modulation of the Host Immune Response. **International Journal of Parasitology**. 24 (1):59-66.
- 38.- Nogge, G. 1978. Aposymbiotic Tsetse Flies, *Glossina morsitans morsitans* Obtained by feeding on Rabbits Immunized Specifically with Symbionts. **Journal of Insect Physiology**. 24:299-304.
- 39.- Ramasamy, S.M. *et al.* 1992. Host Immunity to Mosquitoes: Effect of Antimosquito Antibodies on *Anopheles tessellatus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) **Journal of Medical Entomology**. 29 (6):934-938.
- 40.- Ramasamy, S.M and Ramasamy, R. 1990. Effect of anti-mosquito antibodies on the infectivity of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* to *Anopheles farauti*. **Medical and Veterinary Entomology**. 4: 161-166.
- 41.- Ramasamy, S.M. *et al.* 1990. Anti-mosquito antibodies reduce the susceptibility of *Aedes aegypti* to arbovirus infection. **Medical and Veterinary Entomology**. 4:49-55.
- 42.- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**. 72:248-291.
- 43.- Lowry, O.H. *et al.* 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**. 193:265-275.
- 44.- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227:680-685.
- 45.- Snyder, S.L *et al.* 1972. The subunit composition of *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase in mM Tris. **Biochimie et Biophysica Acta**. 258:178-187.

- 46.- Towbin, H.T. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. ***Proceedings of the National Academic Science of USA.*** 76:4350-4354.
- 47.- Leary, J.J. *et al.* 1983. ***Proceedings of the National Academic Science of USA.*** 76:4045-4049.
- 48.- Wikel, K.S. 1988. Immunological Control of Hematophagous Arthropod Vectors: Utilization of Novel Antigens. ***Veterinary Parasitology.*** 29: 235-264.
- 49.- Gill, J.S. *et al.* 1986. Isolation and Characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum anatolicum* . ***Parasite Immunology.*** 8:12-25.
- 50.- Srikrishnaraj, K.A. *et al.* 1993 Fecundity of *Anopheles tessellatus* reduced by the ingestion of murine anti-mosquito antibodies. ***Medical and Veterinary Entomology.*** 7(1):66-68.
- 51.- Sutherland, G.B. and Ewen, A.B. 1974. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. ***Journal of Insect Physiology.*** 20:655-660.
- 52.- Hatfield, P.R. 1988. Anti-mosquito antibodies and their effects on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. ***Medical and Veterinary Entomology.*** 2:331-338.
- 53.- Kimura, T. *et al.* 1986 The effect of pH on the Early Interaction of West Nile Virus with P388D1 Cells. ***Journal of General Virology.*** 67:2423-2433.
- 54.- Gollins, S.W. and Porterfield, J.S. 1985. Flavivirus Infection Enhancement in Macrophages : an Electron Microscopy Study of Viral Cellular Entry . ***Journal of General Virology.*** 66:1969-1982.
- 55.- Hase, T. *et al.* 1990. Entry and replication of Japanese Encephalitis virus in cultured neurogenic cells. ***Journal of Virological Methods.*** 30: 205-214.
- 56.- Hase, T. *et al.* 1989. Flavivirus entry into cultured mosquito cells and human peripheral blood monocytes. ***Archives of Virology.*** 104:129-143.

57.- Summers, L.P. *et al.* 1989. Flavivirus can mediate Fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures. **Virus Research**. 12:383-392.

58.- Humphery, S.I. and Vincendeau, P. 1993. Absence of Fc receptors on *Aedes albopictus* C6/36 cells permissive for dengue virus 2. **Acta. Virol. Praha**. 37(2-3):202.

59.- Ludwig, V.G. and Smith, F.J. Identification of receptor for Venezuelan Equine Encephalitis Virus from Mosquito Cells. (*in press*).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA