

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I + D ASOCIADA AL CNB-CSIC

**EFEECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA
APOPTOSIS Y ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA EN
MODELOS EXPERIMENTALES DE LA INFECCIÓN
POR EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA
VENEZOLANA**

TESIS DOCTORAL

Milagros del Valle Montiel Aguilar

ALCALÁ DE HENARES, 2011

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIDAD I+D ASOCIADA AL CNB-CSIC



**EFFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LA APOPTOSIS Y
ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA EN MODELOS EXPERIMENTALES
DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA
VENEZOLANA**

TESIS DOCTORAL

Milagros del Valle Montiel Aguilar

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto,
Catedrático de Medicina,
Universidad de Alcalá.

Ernesto Marcelino Bonilla Romero
Catedrático de Medicina,
Universidad del Zulia.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios todo poderoso por ser mi guía y protector en todo momento.
- A las Universidades de Alcalá y del Zulia por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.
- Al Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” forjador de conocimiento y creador de ciencia. Por su apoyo en todo momento.
- Al Dr. Ernesto Bonilla, por su valiosa ayuda, conocimientos brindados y confianza depositada en mí.
- Al Dr. Melchor Álvarez de Mon, por consolidar las bases para que este programa de Doctorado sea una realidad en nuestra Alma Mater, por la oportunidad brindada y la confianza que ha depositado en nuestro trabajo.
- A la Dra. Nereida Valero, por su gran apoyo y guía vital en cada paso de esta investigación, por sus conocimientos brindados, orientación y demostración en cada momento de amistad.
- A la MgSc. Julia Arias, mi gran amiga, por ser mi bastón en los días tristes y cansados, en los alegres y llenos de gozo, que me mantuvieron firme impidiéndome caer; más que mi amiga, compañera de estudio, trabajo y apoyo incondicional en la Sección de Virología eres mi hermana.
- Al Dr. Jesús Mosquera, quien con su gran ayuda y conocimientos contribuyo a dilucidar gran cantidad de información generada en este trabajo.
- A la Dra. Yasmir Quiroz y MgSc Alegría Levy por ayudarme incondicionalmente en la ejecución del trabajo experimental y análisis estadístico.

- A los Virusos, mis compañeros de trabajo y personal que labora en la sección de Virología: Yraima Larreal, Luz Marina Espina, Mery Maldonado, Eddy Meleán, Anaís Nery, Josue Reyes que me brindaron su valiosa colaboración con mucha paciencia, esfuerzo y responsabilidad.
- A mis Compañeras de trabajo de la Universidad del Zulia. Cátedra Práctica Profesional de Inmunología: Elieth Pozo y Yenddy Carrero por su gran apoyo y espíritu de colaboración.
- A mis compañeras de la Coordinación del Laboratorio Clínico de la Escuela de Bioanálisis: Dra. Francisca Monsalve y MgSc. Luciana Costa por todo su apoyo y entusiasmo brindado.
- A mis adorados Hijos por su apoyo, paciencia y entusiasmo mostrado en cada paso de mi vida. Los amo.
- A mis Padres, Hermanos, Sobrinos, Cuñados, Familiares y Amigos en general por su apoyo, comprensión, y entusiasmo, por ese compartir en familia que llena mi corazón, proporcionándome ánimo en todo momento.
- A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a que este trabajo se realizara.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS....

Milagros

DEDICATORIA

**A mis grandes amores: Andrea Carolina y
Diego Andrés.**

ÍNDICE

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	
Summary	
I.- Introducción	
I.1.- Agente etiológico	1
I.2.- Epidemiología	1
I.3.- Patogénesis	4
I.4.- Prevención y control	5
I.5.- Respuesta inmunitaria y mediadores oxidativos	6
I.6.- Melatonina	8
I.7.- Estructura	9
I.8.- Melatonina, receptores y antagonistas	12
I.9.- Óxido Nítrico	15
I.10.- Microglía	17
I.11.- Tipos	21
I.12.- Función de la microglía	21
I.13.- Activación de la microglía	22
I.14.- Marcadores de la microglía	28
I.15.- Función CD200R y CD200	31
I.16.- Inhibición de la activación de la microglía	33
I.17.- Apoptosis	34
I.18.- Apoptosis y necrosis	36
I.19.- Fases de la apoptosis	37
I.20.- Apoptosis y ciclo celular	38
I.21.- Inducción de la apoptosis	40
I.22.- Mecanismo	43
I.23.- Vía intrínseca	43
I.24.- Vía extrínseca	45

I.25.- Mecanismo independiente de las caspasas	48
I.26.- Receptores de membrana celular que median apoptosis y genes	50
I.27.- Otros genes involucrados	51
I.28.- Activadores e inhibidores de la apoptosis	51
I.29.- Papel de la apoptosis en el sistema inmunitario	54
I.30.- Funciones de la apoptosis	54
I.31.- Apoptosis y enfermedad	56
I.32.- Apoptosis e infecciones virales	57
II.- Hipótesis y Objetivos	62
III.- Materiales y Métodos	
III.1.- Virus	67
III.2.- Melatonina	67
III.3.- Sistema <i>in vivo</i>	68
III.3.1.- Animales	68
III.3.2.- Ensayos <i>in vivo</i>	68
III.4.- Recolección de muestras	69
III.5.- Determinación de anticuerpos IgM anti-EEV	69
III.6.- Determinación de la activación de la microglía	70
III.6.1.- Selección del tejido y cortes	70
III.6.2.- Determinación del CD200	70
III.7.- Método de detección de apoptosis por la técnica de TUNEL	71
III.8.- Sistema <i>in vitro</i>	71
III.8.1.- Cultivo de células de neuroblastoma múrido (Na ₂)	71
III.8.2.- Ensayos <i>in vitro</i>	72
III.9.- Cuantificación de óxido nítrico (NO)	72
III.10.- Determinación de malondialdeído (MDA)	72
III.11.- Análisis estadístico	73
IV.- Resultados	

IV.1.- Evaluación del efecto protector <i>in vivo</i> de diferentes dosis de la MLT en la infección por el virus de EEV	75
IV.2.- Evaluación del efecto protector <i>in vivo</i> de la MLT en la infección por el virus de EEV utilizando diferentes esquemas de tratamiento	76
IV.3.- Evaluación del efecto de la MLT sobre la activación de la microglía en la infección por el virus de EEV	80
IV.4.- Evaluación del efecto <i>in vivo</i> de la MLT sobre la apoptosis en la infección por el virus de EEV	84
IV.5.- Determinación del efecto de la MLT sobre la generación de nitritos en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na ₂) infectados por el virus de EEV, tratados o no con MLT	88
IV.6.- Determinación de las concentraciones de MDA en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido infectados por el virus de EEV, tratados o no con MLT	89
IV.7.- Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de la MLT sobre la apoptosis en la infección por el virus de EEV utilizando diferentes esquemas de tratamiento.	90
V.- Discusión	95
VI.- Conclusiones	107
VII.- Bibliografía	109
VIII.- Anexos	

ABREVIATURAS

Acido Kainico (**KA**)
Ácido Tiobarbitúrico (**TBA**)
Anión Hidroxilo (**•OH**)
Anión Superóxido (**O₂**)
Barrera Hematoencefálica (**BHE**)
Catalasa (**CAT**)
Ciclina y kinasas dependiente de ciclina (**CDK**)
Cisteinil-aspartato proteasa (**Caspasas**)
Complejo Principal de Histocompatibilidad (**CMH**)
Dominio efector de muerte (**DED**)
Dominio de reclutamiento de las caspasas (**CARD**)
Dominio de muerte (**DD**)
Dosis Letal Cincuenta (**DL₅₀**)
Encefalomielitis autoinmune experimental (**EAE**)
Encefalitis Equina del Este (**EEE**)
Encefalitis Equina del Oeste (**EEO**)
Encefalitis Equina Venezolana (**EEV**)
Especies de Oxígeno Reactivo (**ROS**)
Factor de Necrosis Tumoral-alfa (**TNF α**)
Factor de Crecimiento Neuronal (**NGF**)
Factor de Crecimiento del Fibroblasto (**FGF**)
Factor Inductor de Apoptosis (**IAF**)
Fitohemaglutinina (**PHA**)
Glutación peroxidasa (**GSH-GPx**)
Glutación reductasa (**GSH-GRd**)
Inhibidor de la Apoptosis (**IAP**)
Interleucina-1 beta (**IL-1 β**)
Interleucina 2 (**IL-2**)
Interleucina 4 (**IL-4**)
Interferon gamma (**IFN γ**)
Intraperitoneal (**i.p.**)

Luzindole (**L Z**)

Malondialdehído (**MDA**)

Medio Mínimo Esencial (**MEM**)

Melatonina (**MLT**)

Membrana Mitocondrial externa (**OMM**)

Multiplicity of infection (**MOI**)

Nefrosis por aminonucleósidos de Puromimicina (**PAN**)

Nitroprusiato de Sodio (**SNP**)

Óxido Nítrico (**NO**)

Óxido Nítrico inducible (**iNOS**)

Peróxido de Hidrógeno (**H₂O₂**)

Poli ADP ribosa polimerasa (**PARP**)

Poros de Transición de permeabilidad mitocondrial (**MPTP**)

Post infección (**p.i.**)

Proteína Kinasa A, B (**PK-A, B**)

Reperfusión isquémica (**IR**)

Sintetasa de Óxido Nítrico (**SON**)

Sistema Nervioso Central (**SNC**)

Superóxido dismutasa (**SOD**)

Superóxido reductasa (**SOR**)

Unidades formadoras de placa por ml (**UFP/ml**)

Virus de la Encefalitis Japonesa (**JEV**)

Virus Semliki Forrest (**SFV**)

Virus West Nile o del Nilo Occidental (**VNW**)

SUMMARY

EFFECT OF MELATONIN ON APOPTOSIS AND MICROGLIA ACTIVACION IN EXPERIMENTAL MODELS OF THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS VIRUS INFECTION

The Venezuelan equine encephalitis virus (VEE) is an infection of economical and clinical relevance in northern South America. It affects, with high morbidity, the central nervous system (CNS) in humans and equines. It has been demonstrated that melatonin (MLT) has a protective effect in viral infections and its role has been evaluated in vivo and in vitro. The interest in MLT has increased due to its influence on apoptosis and microglia activation as an important factor in viral pathogenesis. This study evaluated the effect of MLT on apoptosis and microglia activation in experimental models of VEE virus infection. In vivo assays were performed in albino NMRI mice that were treated subcutaneously with 500 µg of MLT /Kg body weight. Mice were inoculated intra-peritoneally with the Guajira strain of the virus, following three schemes of treatment with MLT: Preventive and Precocious: MLT was administered daily 3 days before and 10 days after viral inoculation. Precocious Treatment: Mice were infected and immediately treated with MLT. Late Treatment: Mice were infected with the virus and treated with MLT 24 hours after the infection. The animals were sacrificed in different periods post infection, five for each experimental group for each assay. Whole blood samples were extracted from the internal angle of the eyes to obtain serum to determine IgM anti VEE antibodies. Then the brain was extracted, previous intracardiac perfusion to determine microglia activation by indirect immunohistochemistry using monoclonal antibody anti mouse CD-200. Apoptosis was determined by TUNEL. For the in vitro assays, murine neuroblastoma (Na₂) cells infected with VEE virus in concentration of 1x10⁻⁶ UFP/ml for 2, 4 y 6 hours at 37°C and treated with different concentrations of MLT (0,1mM; 0,5mM and 1,0mM) were used. In the present study it was demonstrated that preventive treatment with MLT, had protective effect in mice infected with VEE virus, when compared to mice exposed to previous and late treatment with MLT. This was evident on the sixth and seventh day after intraperitoneal injection, when the mortality rate was reduced to 25% and 45% in contrast to the 75% and 100% of

mortality observed in the previous and late treatment, respectively. MLT had an important anti apoptotic effect at day 5 post infection reducing de number of brain apoptotic cells in mice infected by EEV virus. This effect was time dependent. Similarly, the anti apoptotic effect of MLT was demonstrated in neuroblastoma cell cultures at 4 and 6 hours of viral infection. The effect of MLT on microglia activation in viral infection was also observed. Anti-CD200 antibodies positive brain cells were detected in different days post infection. MLT decreased the microglial activation in the brain of infected mice. In conclusion, MLT has experimental therapeutic effect on VEE virus infection, but further clinical approaches has to be done to determine its clinical beneficial effects in humans.

Key words: *Venezuelan Equine Encephalitis, Melatonin, Apoptosis, Microglia.*

I. INTRODUCCIÓN

Agente Etiológico

Las Encefalitis Equinas son enfermedades producidas por un virus de ARN, pertenecientes al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*. Según su etiología, se han identificado la Encefalitis Equina del Este (EEE), la Encefalitis Equina del Oeste (EEO) y la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) que afecta a équidos y a humanos, con una alta morbilidad en individuos de todas las edades (OPS, 1999, Rabinowitz et al., 1973; Mathews et al., 1989). Estos virus aunque son inmunológicamente distintos, provocan enfermedades, que son clínicamente indistinguibles; existe además un cuarto miembro de este género que es el virus Highland, que sólo se ha reportado en el este de los Estados Unidos, específicamente en la Florida, y su presencia está asociada con casos de encefalomielitis en équidos (Calisher et al., 1982; Acha y Szyfres, 1992).

Del virus de EEV se conocen seis subtipos (I-VI) con seis variantes antigénicas del subtipo I y tres del subtipo III; los subtipos IAB y IC son los que ocasionan las epidemias en humanos y en équidos (Bellard et al., 1989; Bennett et al., 1996).

Epidemiología

El virus de EEV se transmite por la picadura de un mosquito infectado; dentro de las especies capaces de transmitir la enfermedad se encuentran el *Culex* (melanoconion), el *Aedes*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Haemagogus*, *Sabethes*, *Deinoceritis* y *Anopheles* (De la Hoz., 2000). Los roedores, burros, caballos, el ganado vacuno, murciélagos y posiblemente las aves y los perros, se consideran reservorios del virus (Dickerman R. et al., 1971).

En la EEV se han identificado dos ciclos, el enzoótico (endémico) y el epizoótico (epidémico). En el primero, se observa en las selvas húmedas de la América tropical y regiones pantanosas donde la transmisión del virus se desarrolla y

se mantiene en la naturaleza, entre roedores que actúan como reservorios y varias especies de mosquito *Culex*, subgénero *melanoconium* que sirven de vectores, para transmitir la infección desde animales virémicos a otros susceptibles (Ludwig et al., 1975; Larreal, 1996). Este ciclo ocurre durante todo el año, ya que su presencia se ha podido demostrar mediante centinelización y aislamiento del virus en vectores y huéspedes (pequeños mamíferos y roedores) de esta enfermedad (Figura. 1). En humanos, la infección por los virus enzoóticos sólo ocurre cuando irrumpe o penetra en focos naturales (Calisher et al., 1982; Ricco et al., 1988; Morse y Schluederberg 1990; Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1994).

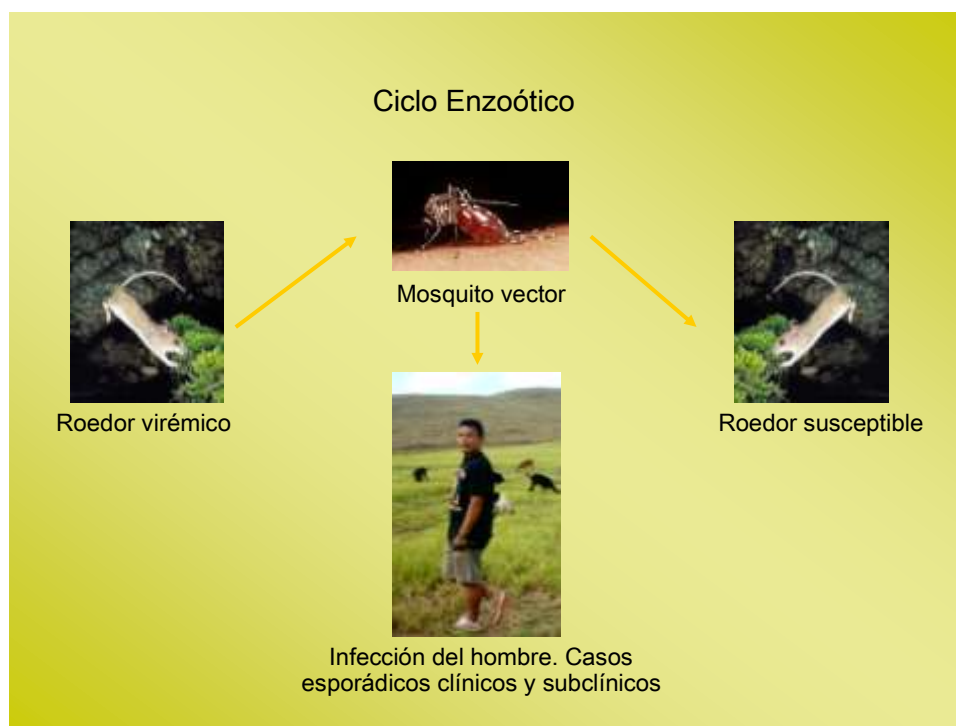


Figura 1. Ciclo Enzoótico o endémico (Ludwig et al., 1975; Larreal, 1996).

El ciclo epizoótico, se mantiene entre équidos virémicos, que actúan como reservorios y varias especies de mosquitos del género *Psorophora*, especies *confinis*, *discolor*, *indubitans*, *titillans* y *mansonía*, así como diferentes especies de los géneros *Aedes* y *Deinocenites pseudos*, que actúan como vectores (Ruíz, 1997). Los équidos representan a su vez el huésped susceptible y son los principales

amplificadores del virus epidémico. Los humanos se constituyen en huéspedes accidentales de la enfermedad. Este ciclo epidémico se caracteriza por una alta morbilidad en humanos y una alta mortalidad en équidos (**Figura. 2**). Al respecto se ha estimado que el porcentaje de mortalidad en la población de équidos, sobre todo en situaciones de brotes, oscila entre 19% y 83%. Mientras que en humanos, ésta es poco frecuente, aunque con valores que oscilan entre un 4% a un 14% en aquellos casos con síntomas neurológicos, siendo la letalidad mayor en niños que en adultos (**Calisher, 1982; Morse y Schluederber, 1990**).



Figura 2. Ciclo Epizoótico o epidémico (Ludwig et al., 1975; Larreal, 1996).

En estudios realizados por **Linthincun y Gordon (1992)**, se encontró que las garrapatas del género *Amblyoma*, especie *cajenense* pueden infectarse, mantener el virus y transmitirlo, detectándose el virus 171 días después de la infección; por lo que se puede considerar que estos artrópodos pueden mantener el virus de EEV en períodos silentes; no obstante, aún no se conoce el papel que puedan jugar éstos en el ciclo de transmisión endémico.

Calisher et al., (1980); Walton et al., (1988) y Weaver et al., (1992), destacan que desde el punto de vista epidemiológico, la característica más importante, es la que permite dividir a las variantes del virus de EEV en epizoóticas y enzoóticas; todas infectan y confieren inmunidad a los équidos y al hombre, pero sólo las variantes IAB y IC, afectan a los équidos (cepas equicidas) y son las responsables de los brotes epidémicos; el resto de las variantes del subtipo I y la mayoría de los subtipos restantes, pueden afectar al hombre, cuando éste se introduce en su hábitat.

Patogénesis de la infección por el virus de Encefalitis Equina Venezolana

Después de la picadura del mosquito infectado, el virus se multiplica en los tejidos locales y los ganglios regionales, produce una viremia y se propaga a los tejidos extraneuronales donde persiste según el grado de multiplicación en estas zonas. El sistema monocito-macrofágico elimina los virus y hacen su aparición los anticuerpos. El virus de EEV invade los tejidos mieloides y linfoides y durante la viremia penetra la barrera hematoencefálica (BHE) e irrumpe el parénquima neuronal (**Bennett et al., 1996**).

La EEV en los humanos y équidos puede variar desde una infección inaparente, hasta una encefalitis o meningitis aguda. El período de incubación de esta enfermedad en los équidos varía de 3 a 5 días, siendo los síntomas iniciales, fiebre, anorexia y depresión, seguidos por signos de hipersensibilidad al ruido y al tacto (**Acha y Syfres, 1992**). Los équidos afectados generalmente caminan en círculo y sin rumbo; por último, el animal presenta parálisis del tren posterior y cae en postración. Los síntomas de la enfermedad en el humano, se caracterizan por tener un comienzo abrupto, con un período de incubación, que varía de 2 a 5 días. La sintomatología puede ir desde un cuadro febril, hasta signos graves de encefalitis, así como también se pueden presentar escalofríos, letargo, dolores occipitales o retroorbitales, anorexia, artralgias y mialgias severas; las náuseas pueden acompañarse con vómitos o ser seguidas por diarreas. Al examen físico pueden presentarse conjuntivitis, taquicardia, adenopatías cervicales, faringitis y

somnolencia; la fase aguda de la enfermedad es seguida por un período de 2 a 3 semanas de letargia y anorexia. Los signos neurológicos asociados al desarrollo de encefalitis incluyen: fotofobia, convulsiones, rigidez del cuello y alteraciones de la conciencia. En las mujeres embarazadas puede ocasionar aborto o efectos teratogénicos (Frank y Johnson, 1997; Acha y Szyfres, 1992; Avilán, 1996; Benenson, 1997).

La EEV es una enfermedad que se ha presentado en forma epidémica y cíclica desde hace varios años, representando así un problema de salud pública de gran importancia en Venezuela. Es considerada uno de los agentes mayormente implicado en la producción de trastornos neurológicos durante los ciclos epizootémicos, que han ocurrido desde el aislamiento del virus en 1938, hasta su última incursión en 1995, inicio de una de las más grandes epidemias descritas. En la misma se reportaron más de trece mil casos en humanos y un número indeterminado de équidos afectados (Valero et al., 2001). La EEV como enfermedad zoonótica tiene importancia económica y social debido a las generadas en el sector productivo agropecuario. En este sentido, es de resaltar que la última epidemia tuvo una importante repercusión en la población humana traducida en costos de tratamientos, atención médica, campañas de vacunación de emergencia, hospitalizaciones, inasistencia al trabajo y escuelas, entre otros.

Prevención y control

Existe una vacuna para equinos basada en la cepa TC-83 que garantiza la no ocurrencia de brotes o epidemias de EEV. Para humanos existe una vacuna a virus vivo atenuado que se usa sólo para el personal de salud que puede estar expuesto en el laboratorio a aerosoles que contengan el virus. También se ha recomendado su uso en personas que por su oficio estén expuestos a un riesgo mayor de infección. Se ha intentado desarrollar vacunas contra el virus de EEV usando otras metodologías como las técnicas de ADN recombinante, pero éstas no han demostrado ser mejores que las de virus atenuados debido a que los títulos que

inducen parecen ser menores y no protegen contra la infección por aerosoles (De la Hoz, 2000).

Encefalitis Equina Venezolana, Respuesta inmunitaria y mediadores oxidativos

En la infección por EEV, se ha reportado elevación de ciertos mediadores inmunitarios como la Interleucina 1 β (IL-1 β), que se ha caracterizado por ser una citocina pro-inflamatoria que participa como mediador en una gran cantidad de procesos implicados en un amplio espectro de patologías del sistema nervioso central (SNC) (Blamire et al., 2000). Igualmente se ha reportado un aumento en la expresión de genes pro- inflamatorios que incluyen los de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), lo cual sugiere que la respuesta inflamatoria mediada por éstos, contribuirá a la neurodegeneración por EEV (Schoneboon et al., 2000). Otros estudios revelan un incremento en la expresión del Interferón gamma (IFN- γ) con una disminución de las Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 4 (IL-4).

Una vez que los virus superan los obstáculos que ofrece la respuesta innata, entran a las células por unión a receptores específicos, bien por fusión o por endocitosis. El receptor clonotípico de las células T (TCR) es un complejo formado por un heterodímero ($\alpha\beta$ o $\gamma\delta$) responsable del reconocimiento antigénico, a menudo en el contexto de las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC), y una serie de cadenas invariantes de función y estequiometría aún inciertas: CD3 (γ , δ y ϵ) y CD247 (ζ). El TCR es crucial en dos momentos de la vida de los linfocitos T. Participa primero en la selección positiva y negativa del repertorio T durante la maduración tímica. Después, en la periferia, es responsable del reconocimiento de antígenos, y desencadena programas funcionales que expanden y diferencian a los clones relevantes en cada caso (Pérez A. et al., 2006).

La respuesta inmunitaria adaptativa depende de la generación de diversas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (Th) y la consecuente producción y secreción de citocinas. Los linfocitos Th en estado no diferenciado, conocidos como linfocitos Th0, requieren que células profesionales le presenten antígenos (células dendríticas) y señales coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) para poder diferenciarse en linfocitos Th1, que son células que secretan IFN- γ y son responsables de colaborar en la respuesta inmunitaria celular, o bien en linfocitos Th2, que secretan Interleucinas (IL), IL-3, IL-4, IL-5, IL-4, IL-10, IL-13 y son responsables de colaborar en la respuesta inmunitaria humoral (Montaño F. et al., 2008). Debido a ello, la diferenciación de las células T humanas refleja los cambios en la expresión de proteínas que controlan el ciclo celular, sobrevivencia, migración y funciones efectoras (Appay V. et al., 2004).

Se ha descrito que la infección por el virus de EEV en el SNC, produce daño a nivel celular, entre otros, por los metabolitos del proceso de oxidación, los cuales son originados por reacciones biológicas necesarias para la formación de compuestos de alta energía utilizados para los procesos metabólicos celulares. Involucran la transferencia de electrones que pueden generar radicales libres o especies de oxígeno reactivo (ROS) dentro de los cuales se encuentran el anión superóxido (O_2^-) y el anión hidroxilo (OH^\cdot), así como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Skaper, 1999). Estos radicales libres en conjunto con las especies reactivas de nitrógeno (Zinder et al., 1992) son fragmentos moleculares extremadamente reactivos que reaccionan agresivamente con otras moléculas y crean compuestos anormales originando el estrés oxidativo con el subsecuente daño en las células y tejidos. El ADN y otras macromoléculas son dañadas por estos radicales libres (Reiter, 2000; Skaper et al., 1999).

También se ha señalado que los productos de la peroxidación lipídica, por ejemplo el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), son una de las consecuencias de este estrés que produce el daño oxidativo en las membranas (Reiter et al., 1998; Romero et al., 1998). Afortunadamente, el sistema inmunitario cuenta

con una serie de enzimas y agentes antioxidantes que contrarrestan y protegen del daño oxidativo. Las enzimas antioxidativas clásicas incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa, (GRd) y la catalasa (CAT) (Reiter, 2000).

El MDA participa en algunos procesos virales, tal como ha sido descrito en niños infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). La infección por este virus ha sido asociada con el estrés oxidativo, produciéndose un incremento de la concentración de MDA en niños e infantes seropositivos y la disminución de antioxidantes en suero (Jareno et al., 1998; Sonnerborg et al., 1988). La existencia de una correlación negativa entre los niveles séricos de MDA en estos pacientes y el conteo de linfocitos TCD4⁺ confirman el involucramiento del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta infección (Jareno et al., 1998).

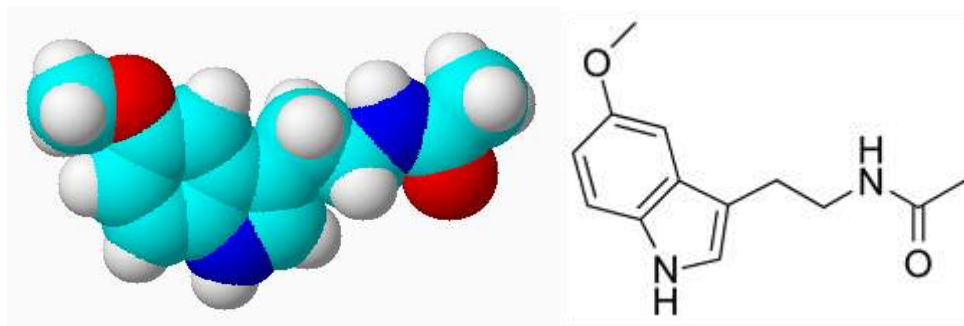
La infección por EEV causa un aumento en la producción de múltiples genes pro-inflamatorios que incluye los de la iNOS y del TNF- α , sugiriendo que la respuesta inflamatoria es en parte mediada por esta enzima y el TNF- α podría contribuir a la neurodegeneración luego de la infección por el virus de EEV (Schoneboom et al., 2000). En cultivos de astrocitos infectados con este virus, se ha observado una elevada producción de TNF- α , pero una baja producción de óxido nítrico (NO), indicando que los astrocitos cumplen un importante papel en la encefalitis inducida por virus y la interacción entre las células gliales y las neuronas podría ser importante en la patogénesis de la EEV (Schoneboom et al, 1999).

Melatonina

La interrelación entre la respuesta inmunitaria y el sistema nervioso, se ha hecho evidente por la existencia de un eje de regulación neuroendocrino inmunitario y el descubrimiento de receptores para neurotransmisores en algunas células inmunitarias (Finochiaro et al., 1991; Guerrero et al., 1994; Dubocovich M., 2005).

Adicionalmente, se ha reportado que las hormonas neuroendocrinas regulan diversos efectos sobre las células inmunitarias (Finnochiaro et al., 1991). Entre las neurohormonas y neuropéptidos que influyen en el sistema inmunitario se incluye la Melatonina (MLT) como un importante miembro de las indolaminas. La MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona lipofílica producida principalmente por la glándula pineal y la retina de los vertebrados, incluyendo humanos (Zhou et al., 2008; Paternoster L. et al., 2009). Sin embargo, se ha encontrado en otra variedad de tejidos como en glándulas lagrimales extra orbitales (Mhatre et al., 1988; M.H. Jang et al, 2005), porciones del tracto gastrointestinal (Vakkuri et al., 1985) y ciertas células sanguíneas (Finnochiaro et al., 1988,1991). Participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos. Es sintetizada a partir del triptófano y es vertida a la circulación para alcanzar sus tejidos blancos, entre los que se encuentra el SNC (Reiter, 1991; M.H. Jang et al, 2005; Zhou et al., 2008).

Estructura



Melatonina: N-acetil-5-metoxitriptamina, Fórmula empírica: $C_{13}H_{16}N_2O_2$ Peso molecular: 232.28 Biodisponibilidad: 30 - 50% (Zhou et al., 2008).

Una de las características más resaltantes con respecto a la biosíntesis pineal de la MLT es su variabilidad a lo largo del ciclo de 24 horas y su respuesta precisa a cambios en la iluminación ambiental (Caroleo et al., 1992). La síntesis y secreción de la MLT sigue un ritmo circadiano y ocurre durante la activación nocturna de los

receptores pineales β -adrenérgicos. La función principal de la MLT es actuar como transductor de la influencia del ciclo luz-oscuridad sobre la fisiología del cuerpo. En humanos, las variaciones del ritmo circadiano en la MLT plasmática, han sido asociadas con la pubertad, ciclo menstrual, desórdenes afectivos, cáncer y con problemas de la insuficiencia renal experimental (**Maestroni et al., 1986; Zhou et al., 2008**). La investigación sobre la glándula pineal, se encuentra en su estadio temprano, pero actualmente, su fisiología, bioquímica y su posible papel inmunomodulador, están siendo estudiadas intensamente. Mucho se conoce, y se continúa investigando sobre el papel fundamental que juega la glándula pineal en el control de los mecanismos inmunitarios. De hecho, la anulación de la ciclicidad de la secreción de la MLT por administración vespertina de β - bloqueadores o por iluminación permanente, permite el deterioro de las respuestas inmunitarias, celular y humoral en roedores y humanos (**Caroleo et al., 1992**).

Igualmente se ha reportado que la administración exógena de esta neurohormona aumenta la producción de anticuerpos (**Maestroni et al., 1986**). Por ello es considerada una hormona con función relevante en la fisiología circadiana (**Caroleo et al., 1992**).

Se ha determinado que esta hormona, influye directa e indirectamente en la modulación del sistema inmunitario, provocando efectos múltiples en sus células (**Angeli et al. 1988, Cuesta et al., 2008, Paredes et al., 2007**). Entre los efectos que provoca esta hormona en el sistema inmunitario se incluye el aumento de la respuesta humoral (**Maestroni et al., 1988**), estimulación de la producción de anticuerpos en células esplénicas de ratón (**Maestroni et al., 1987 y Caroleo et al., 1992**), incremento de la producción del IFN- γ por esplenocitos múridos, atribuido a la liberación de péptidos opioides por las células T cooperadoras (**Colombo et al., 1992**), activación de los monocitos humanos e inducción de la producción de IL-1 y la citotoxicidad de los monocitos contra células tumorales (**Morrey et al., 1994**). También es capaz de aumentar la presentación antigénica a las células T por macrófagos esplénicos e

incrementar la producción de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) clase II y el TNF- α (Pioli et al., 1993).

La MLT inhibe la proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos (Finochiaro et al., 1988) y corrige algunos estados de inmunodeficiencia causados por el estrés (Maestroni et al., 1987; Caroleo et al., 1992; y Maestroni, 1999), el envejecimiento (Caroleo et al., 1992; Humbert, 1993 y Atre et al., 1998), algunas drogas (Caroleo et al., 1992; Maestroni, 1998,1999; Maestroni et al., 1994) y las enfermedades virales (Lissoni et al., 1993; Ben Nathan, 1994, 1995; Bonilla et al., 1997; Maestroni, 1999). Con respecto a estas últimas, diversos autores, reportan el efecto protector de la MLT en infecciones virales producidas por los virus Semliki Forest, West Nile (Lissoni et al., 1993; y Ben-Nathan et al., 1995) y EEV (Bonilla et al., 1997) al prolongar la supervivencia de ratones y retardar el inicio de la enfermedad. Informes recientes indican que la MLT puede controlar el crecimiento tumoral, regula la apoptosis y protege las células del efecto nocivo de especies ROS (Paternoster L. et al., 2009).

La MLT modula los efectos de la inmunosupresión por glucocorticoides, los cuales son inducidos durante las infecciones virales, a través de la diferenciación y/o activación de las células T, mediante la interacción con sus receptores (Maestroni et al., 1986, 1988; Stankov et al., 1991), produciéndose una cascada de eventos que comienza con la síntesis de factores solubles (citocinas), que estimula una serie de componentes del sistema inmunitario, entre los que han reportado: activación de células NK (Reiter, 1995) y fagocitos (Morrey et al., 1994); secreción del Factor Estimulador de Colonias Granulocítico-Macrofágico (GM-CSF) (Maestroni et al., 1994) y activación de los linfocitos T CD8⁺ (Maestroni et al., 1995) y CD4⁺ (González-Haba et al., 1995), produciéndose adicionalmente, un aumento de la síntesis y/o liberación de péptidos opioides (Maestroni et al., 1986, 1988, 1990). Esto sugiere que, las propiedades inmunoestimuladoras de la MLT dependen en parte de la activación de las células T CD4⁺ principalmente, formando un complejo que estimula la producción de IFN γ e IL-2, los cuales estimulan la respuesta efectora.

La MLT cumple sus funciones a través de la donación de un electrón directamente, secuestrando radicales superóxido e hidroxilo altamente tóxicos. Limita la peroxidación lipídica inducida por NO, inhibe la sintetasa de NO cerebral, captura peroxinitritos y estimula la actividad de enzimas que aumentan la capacidad antioxidativa del organismo. La función de la MLT como un capturador de radicales libres y antioxidante es facilitada por su capacidad de atravesar barreras morfofisiológicas como la BHE (Skaper et al., 1999; Reiter et al., 2001).

Ben-Nathan et. al. (1994,1995), fueron los primeros en demostrar el efecto protector de la MLT en ratones infectados con el virus Semliki Forrest (SFV) y en ratones sometidos a estrés inoculados con el virus West Nile atenuado- no invasivo. Este efecto se evidencia por el aumento en la tasa de supervivencia en estos ratones. Resultados similares reportaron Bonilla et. al., (1997); y Valero et. al., (1999) en ratones infectados con el virus de EEV.

Estudios *in vivo* e *in vitro*, demuestran la baja toxicidad de la MLT o sus precursores por lo que podrían ser considerados como neuroprotectores útiles para el tratamiento de patologías cerebrales que involucran citotoxicidad o donde haya daño oxidativo que contribuya a la neuropatogénesis (Skaper et al., 1999).

Es importante destacar que estos hallazgos demuestran la necesidad de continuar en la búsqueda del posible mecanismo de acción de la MLT y su papel terapéutico, durante la infección por el virus de EEV.

Melatonina, receptores y antagonistas

Los mecanismos mediante los cuales la MLT interviene en la función del sistema inmunitario son complejos y probablemente son mediados por la activación de distintos subtipos de receptores de alta afinidad de membrana y/o nucleares de la MLT (Dubocovich et al., 1997), los cuales han sido identificados directamente en linfocitos circulantes, esplenocitos y timocitos (González-Haba et al., 1995; Guerrero et al.,

1994; López-González et al., 1992). Además, por ser un componente altamente lipofílico, la MLT puede penetrar sin mediación de receptores específicos y actuar dentro de las células como un potente secuestrador de radicales libres y como un factor anti-envejecimiento y oncostático (Skwarlo-Sonta, 1996; Maestroni et al., 1990, 1995, 1988; Atre y Blumenthal, 1998; Neri et al., 1998).

El Luzindole (N-acetil-2-benziltriptamina), es un antagonista de los receptores de MLT y se ha demostrado que es un inhibidor competitivo efectivo de éstos en el cerebro; actúa bloqueando las propiedades inmunomoduladoras e inmunorreguladoras de la MLT (Valero et al., 2009) y además se ha demostrado que es activo *in vivo* (Dubocovich, 1988). Sin embargo, estudios previos han determinado que el Luzindole (LZ) no bloquea el efecto antioxidante de la MLT, a pesar de inhibir los receptores para la misma (Behan et al., 1999; Nava et al., 1997).

Se ha reportado que las funciones específicas de la MLT están mediadas a través de la activación de receptores de alta afinidad en la membrana plasmática y que éstos se encuentran acoplados a la proteína G. Se han descrito en base a su estructura molecular, tres subtipos de receptores de MLT, el MT1 y MT2 pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G y el MT3 ubicado en la familia de la enzima quinona-reductasa (Reppert et al., 1995; Skinner et al., 2000; Slaugenhaupt et al., 1995).

El receptor MT1 está expresado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y en los vasos cardiacos; además, está involucrado en la modulación del ritmo circadiano (Dubocovich et al., 1998; Liu et al., 1997) y en la modulación y constricción de los vasos (Doolen et al., 1998). También se expresa en los tejidos periféricos y en otras regiones del cerebro (Clemens et al., 2001; Ram et al., 2002; Scher et al., 2002; Zhao et al., 2000; Zhao et al., 2002). Además de su vasta distribución en los tejidos, el receptor MT1 puede acoplarse a una amplia variedad de proteínas G incluyendo G_{i2} , G_{i3} , $G_{i\alpha}$ (Brydon et al., 1999; Witt-Enderby et al., 2001) y $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 16}$ (Chan et al., 2002; Ho et al., 2001) lo cual explica la diversidad de respuestas a la MLT dentro del organismo.

El receptor MT2 está involucrado en la fisiología retinal (Dubocovich et al., 1997), en la regulación del ritmo circadiano (Dubocovich et al., 1998), en la dilatación de los vasos cardiacos (Doolen et al., 1998), así como en la respuesta inflamatoria (Lotufo et al., 2001). A diferencia del MT1 los receptores MT2 están más limitados en su localización, encontrándose en el cerebro, núcleo supraquiasmático del hipotálamo, la retina, riñones, ovarios, vasos cardiacos y varias líneas celulares cancerígenas (Dubocovich, 2001; Witt-Enderby, 2000; Von Gall et al., 2002); de manera similar a los receptores MT1, los MT2 se acoplan para inhibir la formación del AMPc en varios modelos transfectados (Jones et al., 2000; Brydon et al., 1999; MacKenzie et al., 2002; Reppert et al., 1995).

A diferencia de los receptores MT1, la expresión del MT2 en las células HEK293, también ocasiona un descenso en GMPc. Quizás las diferencias sutiles en las propiedades de señalización y farmacológicas entre MT1 y MT2, proporcionen un elemento esencial para entender los efectos de la MLT en procesos fisiológicos específicos (Petit et al., 1999).

A una proteína que mostraba un perfil enlazante similar al del MT2 (Dubocovich, 1995; Molinari et al., 1996) se le dió el nombre de MT3; fue aislada de riñón de hámster Sirio (Nosjean et al., 2000) y se demostró que tiene un 95% de homología con la quinona-reductasa humana, una enzima involucrada en la desintoxicación (Nosjean et al., 2000). Esta proteína y su actividad asociada se expresa en el hígado, riñón, cerebro, corazón, tejido adiposo marrón, músculo esquelético, pulmón, intestino, testículos y vasos de hámster, ratones, perros y monos (Nosjean et al., 2001). Se ha demostrado, además, que la proteína MT3, está involucrada en la regulación de la presión intraocular en los conejos (Pintor et al., 2001) y en la respuesta inflamatoria en la micro vasculatura (Lotufo et al., 2001).

Hasta ahora, los receptores de MLT de alta afinidad en células inmunocompetentes son importantes sitios de unión que se han descrito en homogeneizados de membrana del timo, bolsa de Fabricio y el bazo, para un número

de aves y mamíferos (Poon et al., 1994). También se ha descrito un sitio de alta afinidad en linfocitos T ayudadores de la médula ósea (Maestroni, 1995). Otro estudio mostró que la MLT se une a las células linfoides humanas modulando su respuesta proliferativa (Maestroni, 1990).

Consistentemente con el hecho de que las células activadas parecen responder más a la MLT, la activación de células T, significativamente incrementa la unión a la misma; los sitios de unión a MLT y los ARNm de estos receptores, fueron hallados mayormente en células T ayudadoras humanas, pero también en TCD8+ y células B. Además, la expresión en monocitos humanos de receptores para MLT depende de su estado de maduración. Más interesantemente, parece ser que la diferenciación relativa de monocitos *in vitro* afecta la expresión de estos receptores. Además, los receptores de membrana y nucleares, se han descrito en células inmunocompetentes en humanos y en roedores (Rafii et al., 1998).

Sitios de unión específicos para MLT han sido descritos en purificados de núcleos de células provenientes del timo y del bazo en ratas. Más recientemente, se ha reportado que el efecto de la MLT en la producción de citocinas en las células mononucleares de sangre periférica humana, parece depender de la activación de receptores nucleares, más que de receptores de membrana. Sin embargo, el papel específico y relativo de receptores de membrana y nucleares sigue aun sin dilucidar (Maestroni, 2001).

Oxido Nítrico

El Óxido Nítrico (NO) es una molécula vasodilatadora que se ha relacionado ampliamente con la regulación del tono vascular, tanto en condiciones normales como patológicas (Lee et al., 1992; Castro et al., 1993; Moncada et al., 1993). Se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS) y es

una molécula altamente inestable, con una vida media de 6 segundos, que se degrada rápidamente a nitratos y nitritos (Stuehr et al., 1985).

Han sido identificadas tres isoformas de NOS: sintetasa del óxido nítrico neuronal o tipo I, sintetasa del óxido nítrico inducible o tipo II y sintetasa del óxido nítrico endotelial o tipo III. La NOS inducible (iNOS) es sintetizada en los macrófagos, células musculares lisas, células estrelladas hepáticas, hepatocitos, y muchos otros tipos celulares, sólo tras inducción por lipopolisacárido (LPS) y citocinas proinflamatorias. Una vez expresada, la iNOS sintetiza grandes cantidades de NO durante largos períodos de tiempo, independientemente de estímulos hemodinámicos o mecánicos (Sessa W., 1994; Ananth C. et al., 2003). En contraste, la NOS endotelial (eNOS) libera NO durante periodos cortos de tiempo en respuesta a varios tipos de estímulos, tanto endógenos como exógenos, incluyendo entre estos los estímulos físicos (Takahashi et al., 1997). Aunque inicialmente la localización de este enzima fue demostrada en las células endoteliales, se ha visto que la expresan también otros tipos celulares, como células mesangiales, gliales, neuronales, y las del epitelio respiratorio.

El NO es una molécula pequeña, simple, extremadamente lábil, de corta vida y altamente nociva debido a su estructura de radical libre; posee un electrón extra que le confiere una elevada reactividad (Zinder et al., 1992). También puede ser producido por un grupo de compuestos conocidos como donadores de NO como el Nitroprusiato de Sodio (NPS) (Lahiri et al., 1999). El NO es sintetizado en células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y células neuronales (Di Mascio et al., 2000). La NOS juega un importante papel en la regulación cardiovascular, en las funciones del SNC y periférico, en las funciones inmunitarias y otros mecanismos homeostáticos. La iNOS también se expresa en neuronas piramidales y células gliales del hipocampo en condición estimulada. Su excesiva producción provoca efectos proinflamatorios y neurotóxicos en respuesta a la inflamación del tejido cerebral (Ananth c. et al., 2003).

Sin embargo, la elevada producción de NO ha sido asociada con un gran número de condiciones patológicas en conjunto con otros factores mediadores de la respuesta del sistema inmunitario. Como ocurre en ratas con encefalitis producida por la infección con el Virus Herpes Simple en donde los elevados niveles de NO producidos sugieren que esta molécula es un factor patogénico en esta infección (Fuji et al., 1999).

Algunos autores como **Shoshkes y Komatsu (1998)**, reportan que la producción de NO podría ser beneficiosa para la resolución de ciertas infecciones virales, inhibiendo la replicación del virus; es el caso de la infección producida por el Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) en la cual, se sugiere que el NO puede jugar un papel crucial en la inmunidad innata del huésped, en los estadios iniciales de la infección en el SNC (Lin et al., 1997). Aún existen muchas incógnitas por despejar en cuanto al papel del NO en las infecciones virales.

Microglía

La existencia de las células gliales o glía, fue descrita por primera vez en 1856, cuando Rudolph Virchow reconoció la presencia de un componente intersticial o tejido conjuntivo en el sistema nervioso envolviendo los componentes nerviosos y que denominó *Nervenkitt* o neuroglía. En 1865, Otto Deiters fue el primero en identificar en el SNC células que no eran neuronas y que correspondían a las células del tejido conjuntivo, a las que llamó células de Deiters. Probablemente Camillo Golgi supuso el inicio del estudio de las células gliales, puesto que su técnica de impregnación argéntica (1885-1886) permitió identificar morfológicamente de manera fiable los distintos tipos celulares del sistema nervioso de los vertebrados. Describió las células gliales como células conjuntivas aracnoideas o estrelladas sin prolongación nerviosa.

En 1893, Michael van Lenhossek introdujo el término de astrocito para hablar de las células de neuroglía de forma estrellada. También en 1893 William Lloyd

Adriezen clasificó la glía en fibrosa principalmente presente en la materia blanca, y protoplasmática, principalmente en la materia gris. La glía fibrosa estaba constituida por células estrelladas, con prolongaciones largas, delgadas y poco ramificadas. La glía protoplasmática estaba constituida por células con numerosas prolongaciones en todas direcciones, cortas y ramificadas. Santiago Ramón y Cajal atribuyó el nombre de astrocitos a estos dos tipos de glía y más tarde describió la presencia del tercer elemento celular del SNC (1913), además de los astrocitos y las neuronas.

En 1921, Pío del Río-Hortega, discípulo de Cajal, describió un nuevo tipo celular en el SNC, la microglía (células de Hortega). Además también fue el primero en teñir y definir otro tipo de células gliales, los oligodendrocitos a los que inicialmente denominó como glía interfascicular. Paralelamente, Wilder Penfield (1924) presentó un estudio sobre oligodendroglía. A principio del siglo XX quedaron definidos los tres tipos principales de células gliales en el SNC: astrocitos, microglía y oligodendrocitos **(Figura 3) (Ramírez-Exposito y Martínez- Martos, 1998)**. Así mismo, se describieron dos grupos claramente diferenciados en función de su origen: En primer lugar está la macroglía, que en el SNC se compone de las células astrogiales y oligodendrocitos, formados en la placa neuronal de forma paralela a las neuronas (en el sistema nervioso periférico (SNP) las células de Schwann se encontrarían dentro de este grupo). Por otro lado, encontramos la microglía, que está constituida por células de menor tamaño.

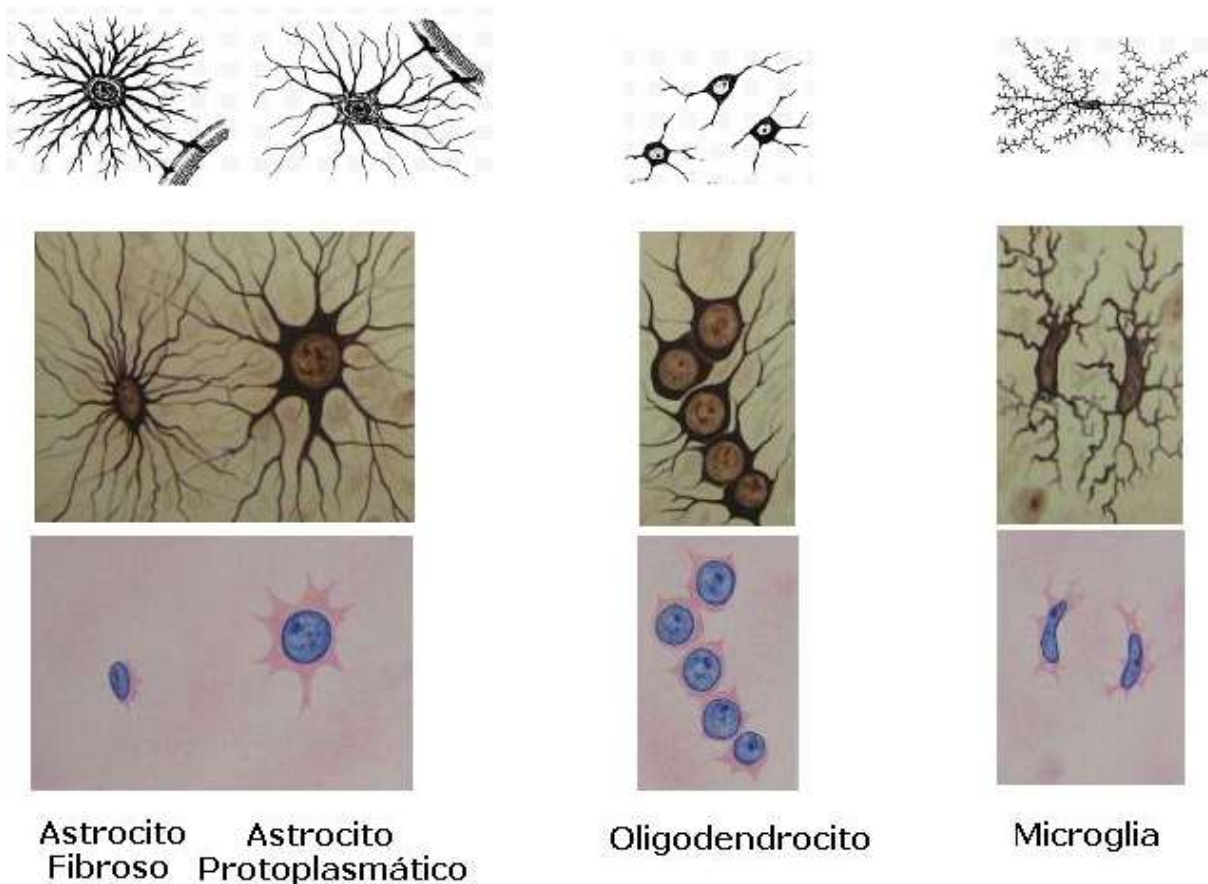


Figura 3. Principales tipos de células gliales: Astrocitos, Oligodendrocitos y Microglía
Fuente: Atlas de Anatomía Prometheus, volumen 3.

Las microglías son células con núcleos densos, pequeños y alargados con prolongaciones cortas e irregulares que tienen capacidad fagocitaria. Se originan en precursores de la médula ósea y alcanzan el sistema nervioso a través de la sangre; representa el sistema fagocítico mononuclear en el SNC. Fueron descritas a inicio del siglo XX por Pío del Río-Hortega como una entidad glial independiente, íntimamente relacionada con patologías del cerebro (Raivich et al., 1999; Gehrmann et al., 1995). La microglía representa de un 10-20% del total de la población de células gliales; se distribuye de manera ubicua en el SNC y está funcionalmente relacionada con los macrófagos de los tejidos periféricos y otras células del linaje monocítico. Tienen un origen mesodérmico, es decir, se derivan de las células precursoras de la médula ósea (Town et al., 2005). Existen estudios *in vitro* que sugieren un origen

neuroectodérmico (Federoff et al., 1997). El papel principal de la microglía es mediar la respuesta inmunitaria intrínseca innata frente a injurias tisulares en una gran variedad de condiciones (Stence et al., 2001). Diversas evidencias sugieren que la microglía juega un papel doble, neuroprotector ó citotóxico, dependiendo de la severidad de la injuria sobre el tejido (Benati et al., 1993).

La microglía constituye el sistema inmunitario del SNC (Kreutzberg, 1996), y como tal, sus principales funciones van dirigidas a detectar y eliminar cualquier posible patógeno, así como los restos celulares presentes en el parénquima. Al igual que los astrocitos, la microglía se distribuye de forma territorial, aunque sus prolongaciones no se adhieren unas a otras (Raivich et al., 2004).

Cuando la microglía se activa sufre un proceso con una serie de cambios morfológicos y funcionales progresivos, en el que podemos diferenciar tres estados. En primer lugar encontramos la llamada **microglía quiescente** o en reposo, que constituye el estado basal en el SNC adulto normal y que presenta gran número de ramificaciones finas y alargadas, que en la materia blanca se orientan en paralelo a las fibras nerviosas y en la materia gris adoptan una morfología estrellada. En segundo lugar está la **microglía activada**, que presenta ramificaciones acortadas y engrosadas, y que es la principal responsable de la síntesis de proteínas proinflamatorias que median en gran parte sus funciones en condiciones patológicas. Por último, tenemos la llamada **microglía ameboide**, la cual con su propio nombre indica, presentar una morfología más globular. Esta última es la encargada de fagocitar el patógeno, restos celulares, depósitos proteicos, entre otros (Raivich et al., 1999; Streit, 2002). Muchos estudios sostienen la idea de que la microglía ameboide que se encuentra perinatalmente, sobretodo en áreas de la materia blanca, como el cuerpo calloso supraventricular, está constituida por macrófagos cerebrales que participan en la eliminación de las células muertas y/o de axones transitorios. Sin embargo, existe un gran número de estudios que evidencian que esta apariencia de la microglía primitiva, similar a la de los macrófagos, puede reflejar un estadio de

inmadurez e indiferenciación. La microglía ameboide está virtualmente ausente en la materia gris (Streit et al., 1999).

Tipos de microglía

La microglía presenta una distribución ubicua dentro del SNC, con diferencias regionales de tal manera que tiene una presencia destacada en zonas como el hipocampo, el telencéfalo olfatorio y en regiones de los ganglios basales y de la sustancia negra (Lawson et al., 1990).

Existen patrones microgliales de exposición muy diferentes debido en gran parte a la composición del microambiente en el que se encuentra. Así, encontramos que las células MHC-II y CD4 positivas se localizan en su mayoría en la sustancia blanca del SNC. Morfológicamente, las mayores diferencias las encontramos entre las células de la sustancia blanca y la gris de tal manera que mientras que la **microglía de la sustancia blanca** presenta ramificaciones paralelas y perpendiculares a las fibras nerviosas, **la microglía de la sustancia gris** presenta una mayor ramificación en todas las direcciones. Los patrones de expresión proteica pueden ser, además, muy diferentes en función tanto del modelo como de la zona del SNC estudiados no sólo en condiciones basales, sino también en condiciones de activación (Carson et al., 2007).

Funciones de la microglía

Las funciones de la microglía en condiciones fisiológicas son mucho más desconocidas que los astrocitos. Sin embargo, día a día se postulan nuevas funciones que la microglía ejerce cuando se encuentra activada, no solamente se encarga de eliminar restos celulares, patógenos o depósitos proteicos del medio extracelular, sino que también participa de una forma activa en procesos tan importantes como la neurogénesis o la remodelación y maduración de la sinapsis (Walton et al., 2006; Battista et al., 2006; Ziv et al., 2006). De esta forma, no sólo es capaz

de captar la actividad neuronal, sino que también es capaz de influir en la supervivencia y en la misma función neuronal. Todo esto apoya la existencia de una activa relación neurona- microglía (Streit, 2002; Van Rossum et al., 2004; Hanisch, 2002; Streit et al., 2005).

Como ya se ha comentado antes, en condiciones fisiológicas la microglía presenta un estado quiescente o de reposo. En dichas condiciones, y a pesar de no presentar una función clara como las que realiza en los diferentes estados de activación, se ha visto que la función principal de la microglía es monitorizar y proteger el bienestar de las neuronas rastreando el medio extracelular con el fin de detectar cualquier posible cambio. La microglía presenta una distribución tridimensional homogénea altamente organizada, a pesar de su elevada motilidad: Así, y aunque el soma presenta una posición más o menos fija, las prolongaciones se mueven continuamente por el medio extracelular de tal manera que en pocas horas el cerebro es completamente rastreado (Nimmerjahn et al., 2005). La microglía establece contactos dinámicos con otras células del SNC como neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos (Nimmerjahn et al., 2005). Además, presenta numerosos receptores que le permiten detectar cualquier cambio sutil que se produzca, como receptores de neurotransmisores, tanto purinérgicos como gabanérgicos, dopaminérgicos y noradrenérgicos (Pocock et al., 2007), receptores de inmunoglobulinas y complementos entre otros. Todo estos recursos servirían para captar múltiples señales, con el fin de mantener o aumentar sus niveles de actividad (Bezzi et al., 2001).

Activación de la microglía

La microglía se activa ante la presencia de una gran cantidad de estímulos tales como una lesión, patógenos, restos celulares u otros elementos “extraños” tales como precipitados proteicos anómalos en el medio extracelular. Dicha respuesta presenta procesos básicos como el cambio morfológico, la proliferación y la fagocitosis, así como la producción de una gran cantidad de mediadores pro y anti-inflamatorios (Biber et al, 2007).

El nivel de activación de la microglía y la expresión de sus receptores depende del tipo y la severidad de lesión del cerebro (Raivich et al., 1999; Streit et al., 1988). Después de una axonotomía reversible, la microglía prolifera y rodea los nervios secretando factores solubles tales como factor de crecimiento del fibroblasto (FGF) y factor de crecimiento del nervio (FCN) (Heumann et al., 1987; Gómez-pinilla et al., 1990; Araujo y Cotman, 1992). También ocurre un incremento en la expresión de varios receptores como los del complemento, FC, trombina, citocinas como la IL-6 (que estimula el crecimiento de los linfocitos B productores de anticuerpos) y la IL-18 (inflamatoria de la glía), quimiocinas (que inician y promueven las reacciones inflamatorias, ya que regulan el tráfico y afluencia al sitio de inflamación de varios tipos celulares y determinan un incremento de su adhesión a las células endoteliales y/o su activación) y de co-receptores de CD4 (CMH clase II) y CD8 (CMH clase I). Así, la microglía parece mostrar un efecto neuroprotector en su estado activado o esferoide, y colabora en la recuperación de neuronas con daños reversibles. Inversamente, la degeneración neuronal inducida por una proteína tóxica llamada ricina (acontecimiento irreversible y letal) da lugar a que la microglía se active completamente como fagocito. Esta etapa de activación está caracterizada por un aumento significativo en la expresión de los marcadores observados en la etapa fagocitaria incluyendo varias integrinas ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$ y $\alpha_M\beta_2$), y antígenos del CMH de clase I y II. Así, la microglía muestra una plasticidad “funcional” notable dependiendo de la severidad de la lesión (Kitamura et al., 1977; Dickson et al., 1991; Lee et al., 2001).

Sin embargo, es importante señalar que en condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en lo que hemos denominado un estado de reposo. Esta descripción no debe llevarnos a confusión, ya que, como hemos explicado, se encuentra continuamente rastreando el medio extracelular en busca de señales que le indiquen el estado general del entorno en el que se encuentra. En dichas condiciones la microglía presenta, a diferencia del resto de macrófagos (incluyendo los macrófagos perivasculares), una baja expresión de CD45 y del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), de moléculas co estimuladoras, así como una baja capacidad endocítica y fagocítica. Esto es debido a que la microglía se encuentra

“inhibida” o “calmada” por una gran cantidad de señales que recibe de las neuronas y también de los astrocitos. Así, la activación glial no sólo se puede desencadenar tras la aparición de señales activadoras, sino también por la desaparición de las señales inhibitorias.

Todas estas señales tienen como característica común que indican la existencia de elementos peligrosos para la integridad funcional y estructural del SNC. Las señales activadoras corresponden a factores que no están normalmente presentes en el medio, como componentes microbianos o componentes intracelulares. Las neuronas también pueden secretar activamente proteínas que producen la activación de la glia, como las quimioquinas CCL21 y CXCL10 o diferentes neurotransmisores, como el glutamato (Biber et al, 2007). Dentro de este grupo también se encuentran aquellas moléculas que solo están presentes en condiciones muy específicas, como complejos inmunoglobulina antígeno o partículas opsonizadas, así como aquellas que están presentes de forma anormal, como los precipitados proteicos. Todas estas señales son detectadas por una gran variedad de receptores presentes tanto en la microglía como los astrocitos. Las señales inhibitorias son aquellas cuya interrupción puede desencadenar la activación. Estas señales engloban los contactos intercelulares neurona-glia, como las parejas CD200-CD200R, CX3CL1-CX3CR1, SIRP α -CD47 (Hanisch et al, 2007) y CD22-CD45 (Mott et al, 2004), y factores solubles liberados al medio por las neuronas que reflejan su estado de actividad, como los neurotransmisores o los neuropeptidos. Dentro de este grupo también podemos incluir otros factores como las citocinas anti inflamatorias interleucina-10 (IL- 10), TGF- β o IL-1ra y diversos glucocorticoides, que son producidos y liberados constitutivamente por las propias células gliales (John et al., 2003).

Por otra parte, es importante mencionar la acción de los nucleótidos y nucleósidos extracelulares en situaciones de daño porque pueden estimular la síntesis de ADN y la proliferación de la microglía, astrocitos y células endoteliales. Cabe destacar que los nucleótidos y nucleósidos junto con el ATP y otros

componentes inducen a que haya un aumento de calcio en esas células, siendo los responsables de su activación, e incluso podrían actuar como sus reguladores endógenos además de serlo también para los oligodendrocitos **(Nearty et al., 1996)**.

Además, la microglía activada libera factores de crecimiento polipeptídicos y citocinas que estimulan la proliferación de células endoteliales capilares del cerebro y cambios reactivos en los astrocitos. Por un lado, la glía juega un papel positivo en los eventos regenerativos post-lesión, pero por el otro, la reacción glial tiene un efecto negativo que se opone a la recuperación de funciones porque desafortunadamente las reacciones gliales a la lesión constituyen también un impedimento a la recuperación posterior, ya que la cicatriz glial hecha por los astrocitos suele considerarse como un obstáculo físico que limita la regeneración axonal **(Streit, 2002)**.

Como hemos dicho, la activación glial se caracteriza, además, por el aumento de una amplia batería de proteínas entre las que se incluyen factores neurotróficos que aumentan la supervivencia de las neuronas, y mediadores pro y anti inflamatorios tales como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, NO y ROS. Por su parte, los astrocitos sintetizan GFAP, S100 β , MAO-B, factores tróficos como NGF, CNTF, BDNF, VEGF, ILF1 y LIF quimiocinas como IL-8, y factores como el GM-CSF y M-CSF que promueven la proliferación de las células microgliales y su diferenciación **(Farina et al, 2007)**. La microglía también sintetiza factores tróficos, como el NGF o el NT-3 **(Elkabes et al, 1996)**, así como un gran número de proteínas de membrana, como el receptor del complemento 3 (CR3), el MHC II y moléculas coestimuladoras, citocinas, quimiocinas y enzimas como NOS-II y COX2 **(Figura 4)**.

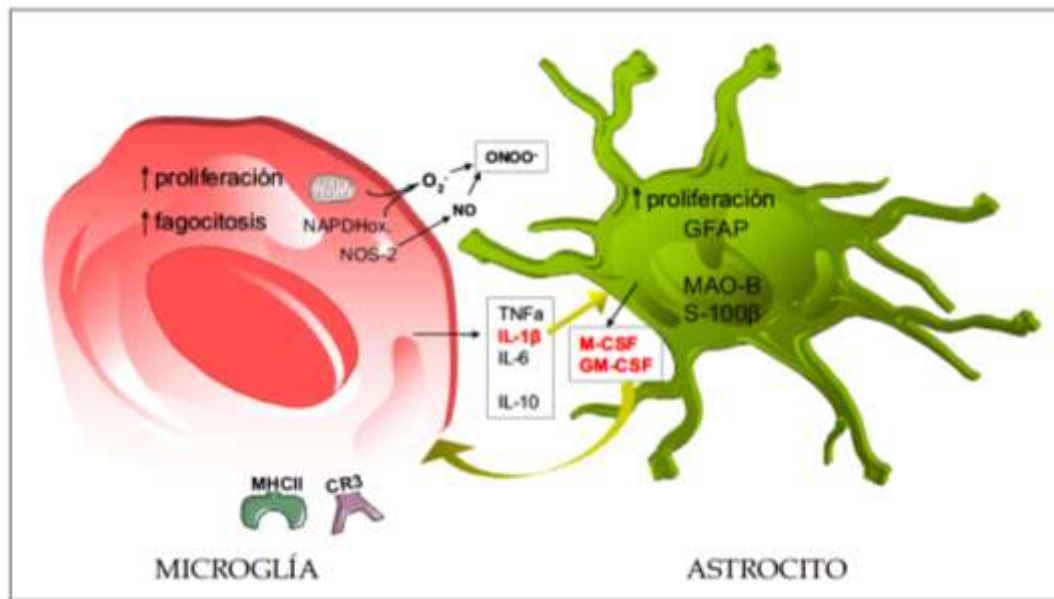


Figura 4. Proteínas producidas por astrocitos y microglía durante la activación glial (Ejarque-Ortiz et al., 2007).

Ahora bien, existe una gran cantidad de reportes que implican la activación y la proliferación excesiva de la microglía en el desarrollo de la muerte neuronal en varios estados patológicos de ciertas enfermedades del SNC. Los ejemplos incluyen: el síndrome de Wernicke-Korsakoff, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, isquemia, y varios HIV-1 (Todd y Butterworth, 1999; McGeer y McGeer, 1998; Walton et al., 1999; Akiyama et al., 2000; Xiong et al., 2000). Una concordancia en los mecanismos observados en estas enfermedades es la producción de una variedad de neurotoxinas en exceso por la microglía, incluyendo el NO, TNFα y especies de oxígeno reactivo como el peróxido (Figura 5). La producción excesiva de esos factores conduce a una cascada de efectos incluyendo la activación de astrocitos, activación adicional de la microglía, y finalmente la muerte neuronal (Lee et al., 2001).

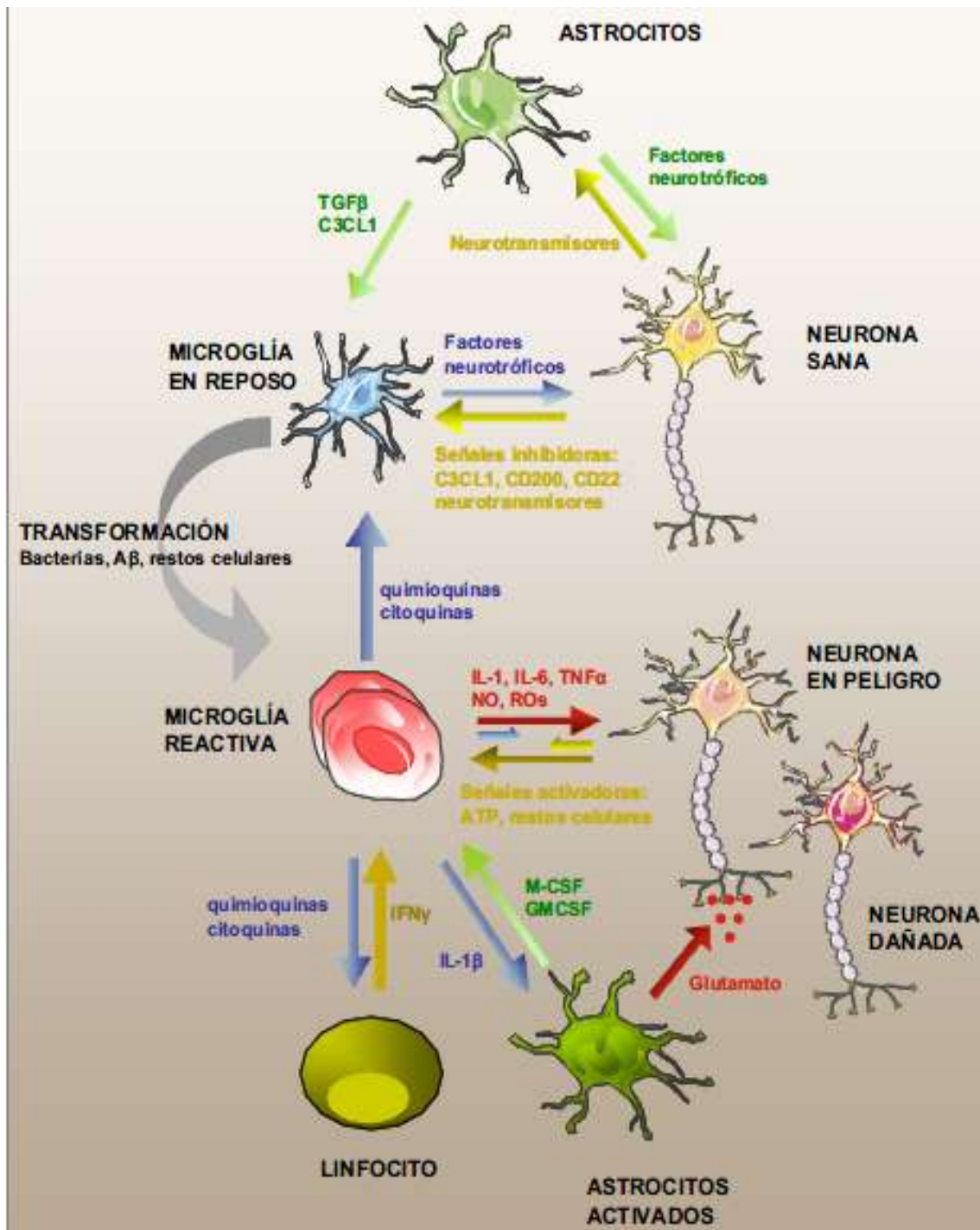


Figura 5. Mediadores implicados en la activación glial y sus posibles consecuencias neurotóxicas (Ejarque-Ortiz et al., 2007).

Marcadores de la microglía

El primer marcaje selectivo utilizado para identificar las células microgliales fue el carbonato de plata amoniacal desarrollado por Pío del Río Hortega. Es un marcaje poco reproducible y muy variable entre especies.

Existen diversos marcadores ampliamente utilizados para el reconocimiento de las células microgliales diferenciándolas del resto de poblaciones gliales. Sin embargo, nos encontramos con más problemas cuando queremos diferenciar la microglía fagocítica de los macrófagos que se infiltran en el SNC en situaciones patológicas, debido a que muchos marcadores son proteínas de membrana compartidas por estas dos poblaciones celulares; entre los marcajes utilizados tenemos varios anticuerpos y varias lectinas (Thomas, 1992; Acarín et al., 1994). Los anticuerpos disponibles se han obtenido contra antígenos específicos de macrófagos y, por lo tanto, reconocen preferencialmente las formas ameboides y reactivas de la microglía. Algunos de estos anticuerpos marcan tenuemente la microglía ramificada, como el OX-42 (también denominado MAC-1 o CD11b) mientras que otros no la marcan en absoluto, como el CD68. Sin embargo, *in vitro* todos estos anticuerpos suelen marcar tanto microglía quiescente como la activada. Una de las formas más usadas para la identificación de la microglía es mediante la utilización de las lectinas. Estas moléculas se unen a los azúcares terminales de las cadenas laterales de los oligosacáridos de las glicoproteínas del SNC que se encuentran integradas en la membrana plasmática. Una lectina muy utilizada es la del tomate (Acarín et al., 1994), que reconoce específicamente la galactosa. Sin embargo, a pesar de que las lectinas también marcan los vasos sanguíneos y los plexos coroideos, dentro del parénquima del SNC son marcadores específicos de las células microgliales, ya que no marcan neuronas, astrocitos ni oligodendrocitos; pero no es exclusiva de las células microgliales, ya que marca también los macrófagos y las células endoteliales. Otros marcadores de membrana como el CD45 o el MHC se expresan a bajos niveles en la microglía quiescente, pero su expresión aumenta en la microglía activada. Así, la intensidad del CD45 permite diferenciar la microglía

quiescente de la activada e incluso de los macrófagos infiltrados (Carson et al., 2007). Actualmente se está extendiendo la utilización del marcaje de IBA-1, *ionized calcium-binding adapter molecule*, una proteína de membrana cuya expresión sólo se ha identificado en células microgliales, células dendríticas y osteoclastos. De esta forma, el marcaje de esta proteína nos permite diferenciar a la microglía de los macrófagos infiltrados (Ladeby et al., 2005). También la microglía expresa el receptor CD200R principalmente expresado por células mieloide (Wright et al., 2003).

El CD200R es una glicoproteína transmembrana que se encuentra en la superficie celular y que actúa de receptor de otra molécula denominada CD200. CD200R se expresa en la superficie de células del tejido mieloide y en linfocitos TCD4+ de sangre periférica (Wright et al., 2003; Wright et al., 2000) mientras que CD200 se expresa en una amplia variedad de tejidos, como son timocitos, células dendríticas foliculares, endotelio vascular, células B recirculantes, células T activadas y neuronas tanto del sistema nervioso central como periférico. Ambas moléculas comparten estructura dado que contienen dos dominios tipo inmunoglobulina e interaccionan entre ellas. Además si se comparan filogenéticamente están muy cercanas lo que indica que ambas proceden de un gen ancestral común. Aunque la existencia de CD200 se conocía desde la década de los 80 (antes conocida como OX-2) no se planteó la existencia de CD200R hasta 1997 (Preston et al., 1997). Aún así, no fue hasta el año 2000, cuando dicha molécula fue caracterizada en ratón (Wright et al., 2000).

Además de los receptores antes mencionados la microglia posee diferentes tipos de receptores implicados en la modulación de la transmisión nociceptiva, tales como, receptores adrenérgicos, serotoninérgico tipo 5-HT_{2a}, purinérgicos, GABAérgicos, glutamatérgicos y glicinérgicos. De esta manera, la actividad de la neuroglia pudiera ser modulada o regulada por diferentes neurotransmisores, entre ellos la 5-HT (Lee et al., 2001; Synowitz et al., 2004). Las células gliales (microglia y astrocitos) de la médula espinal, son críticamente importante en la mediación de los procesos nociceptivos (Watkins et al., 2003). Aunque las células gliales no son

eléctricamente excitables ni establecen sinapsis con las neuronas, mantienen un diálogo continuo entre ellas y con las neuronas de un modo bastante complejo, asegurándose el soporte estructural, metabólico y trófico durante toda la vida (Aschner et al., 2002).

Las respuestas inmunitarias están inhibidas en el cerebro en condiciones normales. Existen evidencias de que las neuronas controlan el estado de activación de la microglía, contribuyendo a su estado quiescente. Uno de los mecanismos sugeridos de cómo las neuronas controlan activación microglial es la interacción con el ligando CD200, una glicoproteína de membrana neuronal, con sus receptores presentes en la microglía (Neuman, 2001). También existen antibióticos con una acción potente y preferencial inhibidora sobre microglía y no sobre astrocitos o neuronas, como es la minociclina una tetraciclina semisintética de segunda generación que penetra bien en el SNC a través de la barrera hematoencefálica (Alonso, 1980). Además de su acción como antibiótico, la minociclina tiene efecto neuroprotector y antiinflamatorio en el SNC (Tikka et al., 2001; Yrjanheikki et al., 1998).

Ciertos estudios han demostrado que las células gliales del cordón espinal, tales como los astrocitos y la microglía, juegan un papel importante en la creación y mantenimiento del dolor patológico inducido por virus y bacterias, elevando las citocinas proinflamatorias (Coyle, 1998; Watkins et al., 1997; Watkins et al., 2001; Watkins y Maier 1999, 2000; Tsuda et al., 2003). La microglía también puede sensibilizarse respondiendo a un estímulo nocivo, expresando el receptor del complemento tipo CD11b en humanos y CR3 en ratas, cuyo ligando es la proteína del complemento iC3b. Se ha demostrado que las células gliales pudieran ser activadas por sustancias relevantes para el mecanismo del dolor como la sustancia P, bradykinina, péptidos, genes relacionados con calcitonina (Fu et al., 1999; Watkins et al., 1997; 2001).

Función de CD200R y CD200

En las primeras observaciones, **Hoek et al., 2000** demostraron, en ratones, que una delección del gen CD200 aumentaba el número de células que expresaban CD200R y los animales mostraban mas susceptibilidad a sufrir artritis inducida por colágeno y encefalomiелitis alérgica experimental, además de presentar un compartimiento mielóide expandido y activado. Las células mieloides y neuronas también presentan un receptor inmune inhibitorio denominado SIRP- α que se une a su ligando que es el CD47 y es similar a CD200. Esta interacción SIRP- α /CD47 causa la inhibición de la actividad de los macrófagos a través de los motivos inhibitorios presentes en el tallo citoplasmático de SIRP- α . Se ha demostrado que esta interacción es importante en la inhibición de la fagocitosis de los macrófagos. La abundante expresión de CD200 y CD47 en el SNC sugiere un importante papel para estas moléculas inhibitorias (**Koning et al., 2007**).

En otro estudio se observó que la interacción de CD200 con CD200R producía un efecto inmunorregulador ya que inhibía la producción de citocinas tipo-1, que son las encargadas de la defensa de tipo celular y producidas por los linfocitos Th1. Estos datos apoyan la idea de que las interacciones CD200-CD200R son importantes en la inmunorregulación que contribuye a determinar la susceptibilidad a la enfermedad autoinmune (**Gorczyński, 2001**). La interacción de CD200 con su receptor provoca una señal inmunosupresora que lleva a la inhibición de los macrófagos, a la inducción de células T reguladoras, cambio del perfil de citocinas desde Th1 a Th2 e inhibición de la inmunidad específica de tumor de las células T (**Moreaux et al., 2008**).

Clark et al. (2003) demuestran que la expresión de CD200 en trofoblastos está relacionada con el éxito en el término de un embarazo ya que cuando la expresión de esta molécula falla se provoca el aborto. Demuestran que el cambio de citocinas de Th1 a Th2 en la superficie feto materno es importante para que un embarazo llegue

a término y que este cambio está influenciado por la expresión de CD200 tanto en los trofoblastos fetales como en la decidua materna.

Se ha observado que durante la muerte celular por apoptosis, los procesos bioquímicos modifican las proteínas propias y crean potenciales auto antígeno. Para mantener la tolerancia, el sistema inmunitario debe controlar las respuestas asociadas a estos autoantígenos. Rosenblum *et al.*, (2004) demuestran que las células dendríticas experimentan un incremento en la expresión de CD200 cuando dichas células entran en apoptosis (fenómeno que ocurre continuamente debido al recambio celular). Además ambos procesos van unidos porque cuando se inhibe la apoptosis utilizando un inhibidor de la misma, como es el Z-VAD-FMK, también es inhibida la expresión de CD200. También encontraron que en la secuencia de CD200 hay 4 posibles sitios de unión a p53 en el primer intrón murino y 2 sitios putativos en el primer intrón humano. Esto es importante porque p53 juega un papel importante en las rutas de señalización iniciadas en las células apoptóticas, lo que sugiere que CD200 juega un papel en la tolerancia inmune asociada a la apoptosis (Clark *et al.*, 2003; Rosenblum *et al.*, 2004).

CD200R también ha sido analizado en mastocitos tanto humanos como de ratón y se ha visto que desarrolla un papel importante en la respuesta inmunitaria inhibitoria (Cherwinski *et al.*, 2005).

Recientemente se ha demostrado que tanto Dok-1 como Dok-2 se asocian a CD200R y median su función inhibitoria (Zhang *et al.*, 2004b; Zhang and Phillips, 2006). Además se ha demostrado que la unión de CD200R por su ligando CD200 no es necesaria para la mielopoiesis en ratones normales ya que el desarrollo de leucemia en ratones DKO no fue causada por un defecto en la señalización de CD200R (Rijkers *et al.*, 2007).

Muchos estudios sugieren que la señalización producida por la interacción CD200-CD200R disminuye la actividad de las células mieloides (Jenmalm *et al.*, 2006).

Se ha descrito una relación entre esta interacción y la enfermedad de Parkinson ya que CD200 transmite una señal a través del receptor de CD200 para regular la activación de la microglía y este suceso está bastante relacionado con la patogénesis y la progresión de la enfermedad de Parkinson (Wang et al., 2007).

CD200 está también implicada en la inmunosupresión en las neoplasias de células B. Las células B de la leucemia linfocítica crónica expresan CD200, lo que lleva a la inhibición de la respuesta Th1 en las reacciones linfocitarias (McWhirter et al., 2006). Simelyte et al., 2008 realizaron estudios empleando un ligando soluble de CD200R para tratar la artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones. El resultado ha sido, que este tratamiento ha reducido la gravedad de los síntomas tanto clínicos como histológicos e incluso empleando menos dosis que el TNFR-Fc. La administración de CD200R-Fc disminuyó los niveles de expresión de RNAm para el TNF- α , la IL-1 β , la IL-10 y la metaloproteinasa 13 (MMP-13) en las articulaciones.

Otro artículo demuestra la expresión de CD200R tanto en células T como células B, y esto ocurre tanto en humanos como en ratones (Rijkers et al., 2008). También se expresa en bazo y en los nódulos linfáticos (Simelyte et al., 2008).

Inhibición de la activación de la microglía

Además de los mecanismos de activación, existen circuitos químicos y metabólicos de carácter autocrino y paracrino que inactivan los macrófagos (Figura 6). Las citocinas pueden inhibir la activación, la liberación de radicales libres y la expresión de antígenos del MCH clase II. El TGF- β también disminuye la producción de NO. *In vivo* se puede observar que la administración de TGF- β atenúa el daño cerebrovascular y el edema cerebral que se observa en la meningitis por neumococo. La IL-13 suprime el desarrollo de la Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La IL-6 disminuye la dismielinización que se observa en la encefalomiелitis viral en roedores.

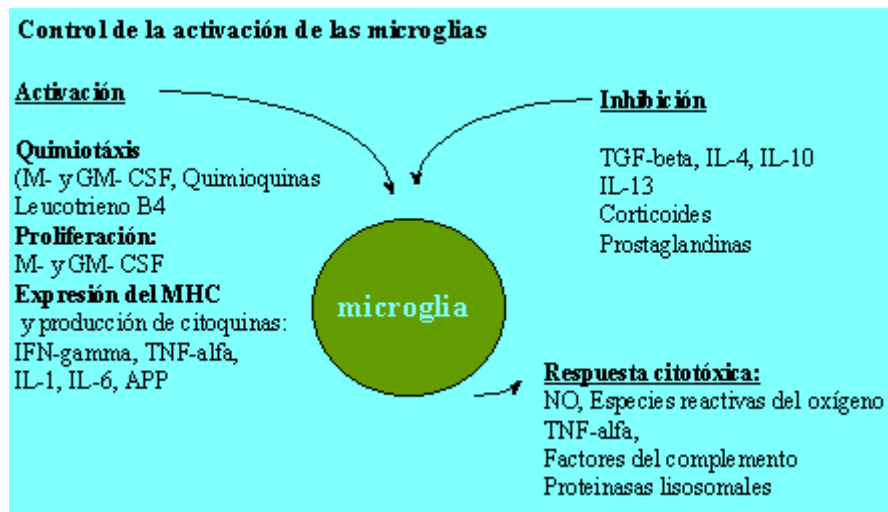


Figura 6. Control de la Activación de la Microglía.

Fuente: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/./microglia.htm>

Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programado que juega un papel importante en el desarrollo y en el crecimiento de tejidos normales (Gerscheson L. et al., 1992; Lodish H. et al., 2005; Broker et al., 2005; Burgués et al, 2005; Espino J. et al 2010). Ha sido definida como un mecanismo de muerte celular fisiológica que se caracteriza básicamente por presentar alteraciones morfológicas y bioquímicas a nivel celular; ocurre durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario (Mark J. et al., 1993; Arango M, et al., 1997; Broker et al., 2005; Burgués et al., 2005; Lodish H. et al., 2005; Espino J. et al 2010). Es considerada como un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), con alteraciones del citoesqueleto (**Figura 7**). Durante el proceso final ocurre fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal del ADN y se forma fragmentos nucleares recubiertos de membrana llamados cuerpos apoptóticos, que

son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria. Esta fagocitosis está mediada por receptores y ligandos situados en la superficie de la célula fagocítica y la célula apoptótica (Arango M. et al., 1997; Broker et al., 2005; Burgués et al., 2005).

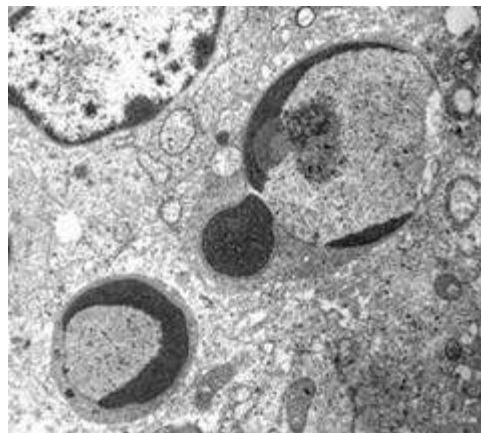


Figura 7. Linfocitos en apoptosis con condensación de la cromatina (Burgués et al, 2005).

Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores (Zmasek et al. 2007). Existe una larga lista de compuestos que generan la inducción o inhibición de la apoptosis. Como **inductores** podemos encontrar activadores fisiológicos (falta de factores de crecimiento, calcio, proteínas proapoptóticas, glucocorticoides), agentes que dañan la célula (choques térmicos, radicales libres, proteínas supresoras de tumores), agentes terapéuticos anticancerígenos (drogas, radiaciones) y toxinas (etanol, péptido beta-amiloide). Como **inhibidores** se presentan los de tipo fisiológico (factores de crecimiento, hormonas, zinc), genes víricos (adenovirus, herpesvirus, virus Epstein-Barr, poxvirus) y agentes farmacológicos (promotores de tumores) (Zmasek et al., 2007).

Apoptosis y Necrosis

Dos formas de muerte celular son habituales en el organismo: necrosis y apoptosis. Las características morfológicas de ambas permiten, en la mayoría de los tejidos establecer claras diferencias. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de un proceso pasivo, accidental que no requiere de síntesis proteica, y es causado por la pérdida de la homeostasia. Se caracteriza por daño mitocondrial, rotura de la membrana, lisis celular y liberación de su contenido al medio extracelular. Este daño está desencadenado por cambios ambientales como la isquemia, temperaturas extremas y traumatismos mecánicos (Broker et al., 2005). En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido, resultando un proceso “silencioso” sin inflamación. En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunos orgánulos, en especial las mitocondrias que tienen un rol interactivo importante. A nivel nuclear la cromatina se condensa. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo (**Figura 8**). Finalmente, los fagocitos captan la célula en su totalidad impidiendo que se produzca alarma en el resto del tejido. Se ha demostrado, al menos en tejidos epiteliales, que si algo de material apoptótico escapa a la acción de los fagocitos es captado por células vecinas. La participación de células vecinas en este proceso se manifiesta además por la capacidad de éstas de enviar señales moleculares a la célula que debe morir como mecanismo complementario al que desarrolla la célula misma cuando se determina molecularmente su autodestrucción (Cascales M., 2003; Bernhardt R., 2004).

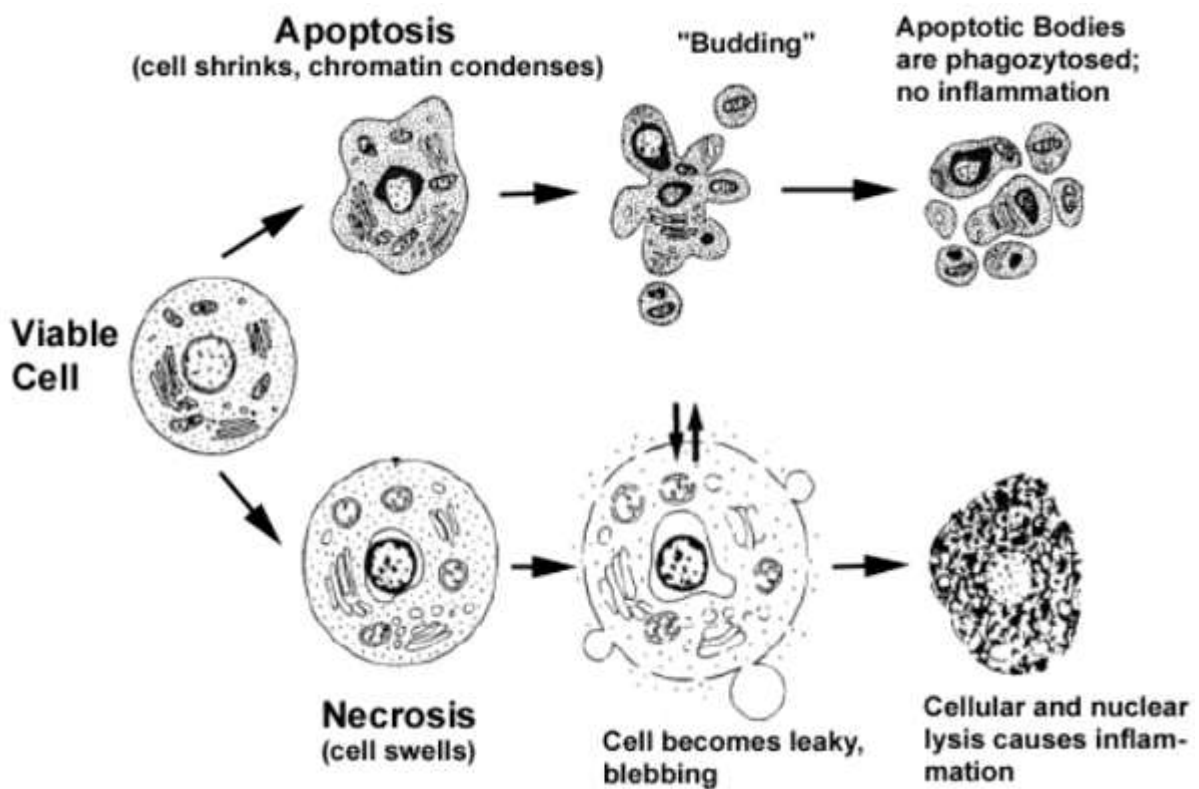


Figura 8. Marcadores del proceso de apoptosis y necrosis. La apoptosis incluye contracción de la célula, condensación de la cromatina y desplazamiento de la misma a la periferia nuclear con la formación de cuerpos apoptóticos, que contienen orgánulos, citosol y fragmentos nucleares, que son fagocitados sin desencadenar procesos de inflamación. Las células necróticas se hinchan, se hacen permeables y finalmente se rompen liberando todo su contenido provocando la inflamación (Van Cruchten, 2002).

Fases en la apoptosis

- **Fase efectora**, adopción sin retorno del compromiso hacia la muerte. Se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{++} intracelular, que origina la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto celular que producen cambios en el tamaño y forma celular.

- **Fase degradativa**, se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos y hay cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el ADN, las caspasas degradan las proteínas, se producen cambios marcados en el citoesqueleto, y se condensa la cromatina.
- **Fase de eliminación**, los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos de la fosfatidilserina, presentes en la superficie de las células apoptóticas (Cascales M., 2003).

Apoptosis y ciclo celular

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases (**Figura. 9**) en la fase G₀ o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G₁ (*gap 1*) de presíntesis, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G₂ (*gap2*) o de postsíntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis. El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “arrestadas” en G₀ durante años (Burgués et al., 2005).

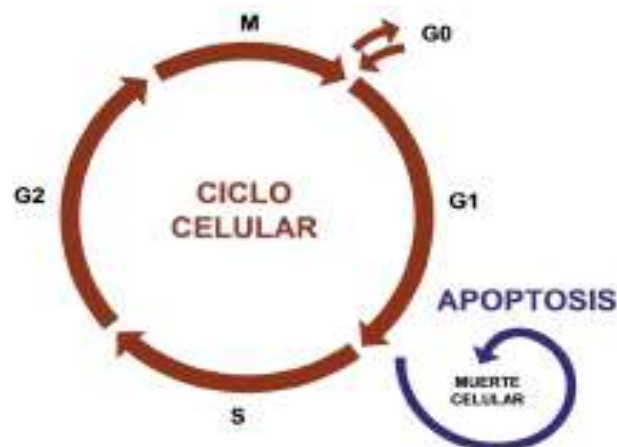


Figura 9. Ciclo celular y apoptosis. En el ciclo celular se distinguen varias fases: **G0.** Fase de reposo; **G1.** Fase de presíntesis; **S.** Fase de síntesis; **G2.** Fase de postsíntesis; **M.** Mitosis. En la apoptosis se produce la activación de las caspasas que inducen la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, la destrucción nuclear y citoplásmica y, por último, la fagocitosis por macrófagos (Burgués et al., 2005).

La maquinaria del ciclo celular son complejos proteicos formados por subunidades llamadas ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDK), sintetizados por genes específicos. La síntesis de estos complejos es constante porque son altamente inestables, de ahí que el nivel de ellos varíe de acuerdo al momento evolutivo de la fase a que están asignados. Así, en el avance de la fase G1 a la S actúa la ciclina D asociada a las kinasas ciclinodependiente 2, 4 y 6 (cdk 2 4 6). En la segunda mitad del G1 aumenta la presencia de ciclina E con la Kinasa ciclinodependiente 2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A con cdk 2 y en la fase G2, la ciclina B con cdk 2. En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G0 (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse y la célula bloquea su crecimiento pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción (en unión de los 2/3 con 1/3 final de esta fase) en que se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares (en especial su ADN), lo que si no se consigue induce el mecanismo de muerte celular. En la fase G2 también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la

célula no está capacitada para entrar en mitosis. De esta manera, durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido (Burgués et al., 2005).

Inducción de la apoptosis

Para que una célula sea inducida a morir por apoptosis se necesita que dicha célula deje de recibir señales de supervivencia y comience a recibir señales de muerte. Las señales estimuladoras de la supervivencia son necesarias para que las células se mantengan vivas. Estas señales han de ser continuas y proceden de otras células. Entre estas señales positivas están los factores del crecimiento y las hormonas. En ciertos tipos de células hematopoyéticas, el crecimiento y la supervivencia depende de la presencia continua de factores del crecimiento (CSF, factores estimuladores de colonias), y la eliminación de ellos conduce irremediablemente a la apoptosis en lugar de a la cesación del crecimiento. Las señales de muerte que conducen a la apoptosis son muy diversas: elevados niveles de oxidantes en el interior de la célula; lesión del ADN por oxidantes, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, fármacos quimioterapéuticos, entre otros; moléculas que se unen a receptores específicos en la superficie de la célula y transmiten señales para iniciar el programa apoptótico. Entre estos activadores de muerte se encuentran el TNF α que se une al TNFR, el ligando Fas (FasL) que se une al receptor Fas, denominado también CD95 (Cascales M., 2003).

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasa (caspasas) (Espino J. et al., 2010). Se han descrito 14 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Desde el punto de vista funcional se ha descrito que algunas caspasas intervienen como iniciadoras (caspasas 8, 9 10) y otras como efectoras (caspasas 3, 6 y 7) del proceso catalítico, actuando sobre

endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La caspasa -8, fue identificado como el iniciador más importante de la vía Fas/CD95, y la caspasa-9, interactúa con muchos otros reguladores y transductores, como el citocromo c, en la vía intrínseca. En cuanto a la caspasa- 3 se ha considerado la más importante entre ellos, ejecuta el desmontaje final de la célula por la ruptura de una variedad de estructuras proteicas celular y generando rupturas de cadenas de ADN (Espino J. et al., 2010).

Las caspasas iniciadoras se activan después de un estímulo apoptótico por autoproteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo. Son las verdaderas ejecutoras de la apoptosis y presentan las características siguientes:

- a. Son cisteína proteasas específicas de aspartato porque tienen cisteína como grupo nucleofílico para la rotura del sustrato y tienen un requerimiento específico por el residuo aspartato (D) de sus sustratos que los rompen en los enlaces D-X.
- b. Son sintetizadas como procaspasas que adquieren su actividad por proteólisis.
- c. Efectúan la proteólisis en una serie específica de sustratos, proceso que es irreversible.
- d. Las caspasas y sus inhibidores siempre coexisten en las células normales, lo cual previene de una activación accidental que supondría una muerte innecesaria de células normales.

Las procaspasas (30-50kD) contienen tres dominios: un predominio N-terminal, una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). En base a la similitud de la secuencia entre los dominios de las subunidades, estas caspasas se dividen en tres grupos: El grupo *inflamatorio* que comprende a las caspasas -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14, el grupo *iniciador* de la apoptosis que incluye las caspasas -2, -

8, -9, -10, y el grupo *efector o ejecutor* de la apoptosis que incluye a las restantes (Cascales M., 2003).

Las caspasas inflamatorias y las iniciadoras poseen prodominios largos, excepto para la 14 que no lo tiene o lo tiene muy corto. El prodominio largo contiene el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD). DED y CARD se parecen al dominio de muerte (DD); y los tres pertenecen a la superfamilia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores y juegan importantes papeles en la activación de las procaspasas. Por el contrario, los prodominios cortos de las caspasas ejecutoras no es probable que puedan mediar interacciones entre proteínas.

Ha sido determinada la estructura tridimensional de las caspasas -1, -3, y -8: Se componen de dos heterodímeros (p10-p20) que se unen para formar un tetrámero dispuesto en dirección opuesta, con las dos subunidades pequeñas adyacentes rodeadas por las dos subunidades grandes (Cascales M., 2003). Cada heterodímero contiene un sitio activo al que contribuyen las dos subunidades con residuos necesarios para la unión al sustrato y la catálisis (Figura 10).

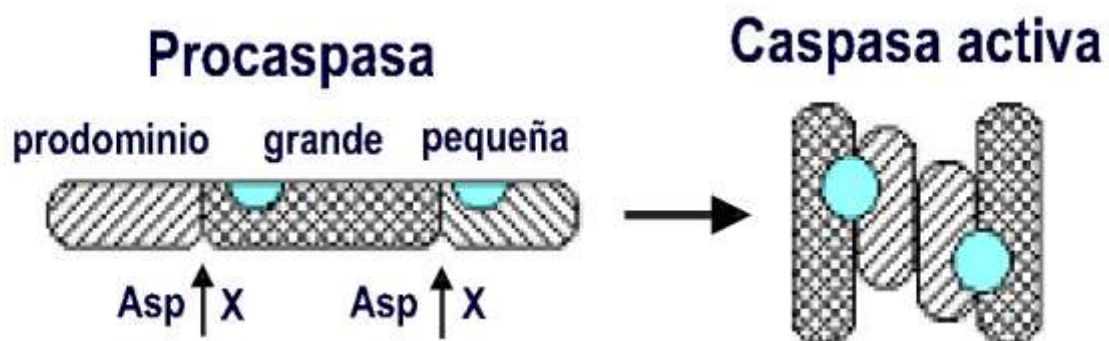


Figura 10. Activación de procaspasas, contiene tres dominios: un prodominio, una subunidad grande y otra pequeña (Cascales M., 2003).

La capacidad proteolítica de las caspasas activas conduce a la degradación de una serie de proteínas y lleva consigo las misiones siguientes:

- Cortar contactos con células vecinas.
- Reorganizar el citoesqueleto.
- Activar las endonucleasas (fragmentación del ADN).
- Desmantelar las láminas nucleares (condensación).
- Expresar señales de fagocitosis (fosfatidilserina) y
- Activar proteínas específicas para preparar a la célula para el cese de las funciones metabólicas.

En general, son dos las vías que conducen a la activación de las caspasas. Una es la mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular; y la otra es la mediada por estrés celular o por lesión en el ADN. Estas dos vías, también denominada extrínseca e intrínseca, respectivamente, pueden solaparse, aunque, la transducción de señales es diferente.

Mecanismo

La cascada apoptótica puede ser iniciada por dos vías o rutas principales, una que implica la liberación del citocromo c desde la mitocondria (ruta intrínseca) y otra que se desencadena por activación de receptores de muerte en respuesta a un ligando (ruta extrínseca). Siguiendo a la activación por cualquier ruta, una familia específica de cistein proteasas, las caspasas, es activada para ejecutar el destino de las células de un modo programado llevando a los típicos cambios morfológicos (Degterev, Boyce, and Yuan, 2003; Gilmore, 2005).

Vía intrínseca

Los marcadores morfológicos que definen una célula apoptótica son el resultado de la activación de las proteasas denominadas “caspasas.” Las caspasas

son cistein proteasas que cortan a las proteínas en residuos conservados de ácido aspártico. Se han clasificado como iniciadoras (caspasa-2, -8 -9 y -10) y ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7) (**Figura 11**). Estas moléculas existen en la célula como zimógenos con una actividad muy baja. Para su activación requieren, en la mayoría de las células, la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (OMM, en sus siglas en ingles) (**Martinou and Green, 2001; Zamzami and Kroemer, 2001**). Dicho proceso libera una multitud de factores cuyo efecto combinado es la activación de las caspasas. El citocromo c actúa como cofactor e interactúa con APAF-1 (apoptotic protease activation factor 1) lo que conlleva a la activación de la caspasa 9. La activación de la caspasa 9 es facilitada por su asociación con APAF-1 que se une al citocromo c en una estructura denominada apoptosoma (**Reddig and Juliano, 2005**).

Otros factores como el Smac/DIABLO (Second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI), bloquean al IAP (inhibitor of apoptosis protein) cuya función es inhibir a las caspasas activadas. Esta permeabilización de la OMM inicia la cascada de caspasas y va a desembocar en la muerte celular. Los miembros de la familia de Bcl-2 previenen la apoptosis manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial, evitando la formación de poros y desestructuración de la OMM. Dentro de esta familia se incluyen 3 grupos:

- Las proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1.
- Proteínas como Bax y Bak (**Bouillet and Strasser, 2002; Chittenden et al., 1995**) y Bok cuyo papel consiste en promover la apoptosis cuando son sobre expresadas. Aunque Bax puede ser regulado transcripcionalmente (por p53), tanto Bax como Bak son principalmente controlados post-translacionalmente. Bax y Bak existen en las células saludables en una forma latente e inactiva (**Griffiths et al., 1999**). La forma inactiva de Bak reside en la OMM mientras que Bax se encuentra en el citosol y se transloca a la mitocondria durante la apoptosis en respuesta a muchos estímulos apoptóticos, por ejemplo, células despegadas de la ECM estimulan la translocación de Bax en quince minutos. En la OMM ocurre la

activación de Bax, que sufre un cambio conformacional y forma complejos oligoméricos.

- Proteínas tipo BH-3, que incluyen a Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma y Hrk. Es el grupo más grande y diverso de la maquinaria apoptótica. Actúan como sensores vigilando las señales apoptóticas que las células producen. Estas proteínas interactúan con los otros tipos y unas promueven la actividad pro-apoptótica mientras que otras la inhiben. Dos miembros de esta familia, Bim y Bmf detectan cambios en el citoesqueleto de actina (**Puthalakath et al., 1999**). Algunas de estas proteínas BH-3 son reguladas a nivel transcripcional. Por ejemplo, PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis) y Noxa son regulados positivamente por una ruta dependiente de p53 (**Nakano and Vousden, 2001; Shibue et al., 2003**). Otras proteínas BH-3 son transcripcionalmente reguladas por factores de crecimiento, como Bid y otras post-translacionalmente. Bad es regulado por fosforilación, por parte de diferentes kinasas que lo fosforilan en distintos sitios (**Harada et al., 1999; Zha et al., 1996**). Algunas de las kinasas implicadas en su regulación son PKB, PKA (protein kinase A) y PAK-1 (p21-activated kinase), las cuales son componentes críticos de la señalización dependiente de la adhesión.

Vía extrínseca

La vía extrínseca es iniciada por la unión de los ligandos de muerte extracelulares, como FasL (Fas Ligando) o TNF a sus receptores transmembrana denominados receptores de Fas y TNF respectivamente (**Figura 11**) (**Chiarugi and Giannoni, 2008**). Esto lleva a la formación del DISC (death-inducing signalling complex), cuya función es captar proteínas adaptadoras como FADD, las cuales sucesivamente van agregando varias moléculas de caspasa-8 promoviendo así su activación y autoprosesamiento. La caspasa-8 procesa proteolíticamente y activa a las caspasas 3 y 7, provocando la activación del resto de caspasas que culminan en la proteólisis y muerte celular (**Taylor, Cullen, and Martín, 2008**). Las células que

responden a los ligandos de muerte extracelulares se dividen en dos clases (**Green, 2000**).

- Células de tipo I: la caspasa 8 es suficiente para iniciar la cascada de efectores de caspasas que llevan a la muerte celular.
- Células de tipo II: la caspasa 8 no puede comenzar ella sola la apoptosis, de hecho en estas células se entrecruza la vía intrínseca con la extrínseca ya que necesita una amplificación vía mitocondria y esto lo consigue con la ruptura de Bid. El complejo formado por los fragmentos de Bid activan la liberación de citocromo c y a Bax, que lo lleva a su oligomerización y por consiguiente a la permeabilización de la OMM (**Eskes et al., 2000; Kuwana et al., 2002**). Es interesante destacar que durante la anoikis (apoptosis que se produce en respuesta a la falta de adhesión o a una inadecuada unión a la matriz extracelular) de células epiteliales de mamífero, Bid es translocado a la mitocondria como proteína completa y su ruptura no es necesaria para la anoikis (**Wang et al., 2003**).

Se ha demostrado que la activación del EGFR (epidermal growth factor receptor) y la posterior estimulación de la cascada de PI3K y Erk/MAPK son capaces de suprimir la actividad de factores apoptóticos. En células adherentes, EGFR reprime la expresión de Bim, a través de la ruta Erk/MAPK por fosforilación, y lleva a su degradación. La inhibición de Bim evita la destrucción de la mitocondria y la inducción de la muerte celular. La pérdida de la interacción de la integrina $\beta 1$ con la matriz, en las células despegadas, reprimió la expresión de EGFR e incremento la expresión de Bim (**Reginato et al., 2003; Shen and Kramer, 2004**). Las señales de supervivencia, a través de la adhesión que suprimen la anoikis, presentan una forma dependiente y otra independiente de Bim (**Marani et al., 2004**).

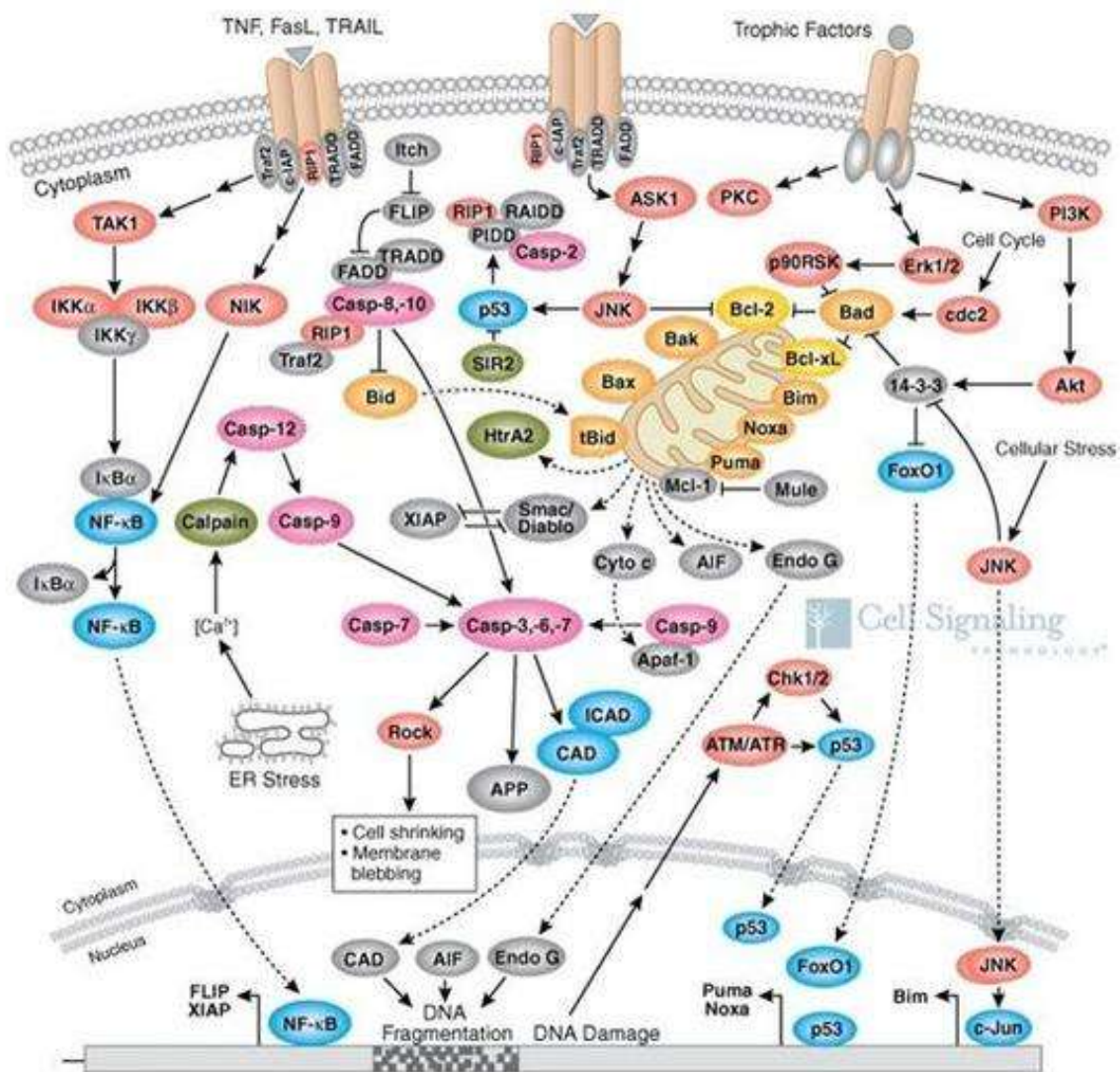


Figura 11. Esquema molecular general de la vía intrínseca y extrínseca de apoptosis
Fuente: Cell Signaling. Technology 2009-10 Catalog & Technical Reference.

Se ha reportado que la vía intrínseca puede representar el principal objetivo de la melatonina (MLT) para antagonizar la apoptosis en los leucocitos humanos y en otras líneas celulares tumorales y en modelos *in vivo* (Radogna et al, 2008; Espino J. et al., 2010). De hecho, ciertas evidencias indican que en la relación MLT- mitocondrias incluye las propiedades antiapoptóticas de la indolamina a través de la interacción con el MPTP (Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial) (Espino J. et al., 2010).

Mecanismo independiente de caspasas

En los últimos años se ha visto que la evidente dicotomía de apoptosis versus necrosis era una simplificación de un proceso altamente sofisticado que protege a los organismos de las células indeseables y potencialmente nocivas. Existen muchas evidencias de que la muerte celular programada también puede ocurrir en ausencia de caspasas y otras proteasas no caspasas han sido descritas como capaces de ejecutar este proceso (Broker, Kruyt, and Giaccone, 2005). Además este proceso independiente se ha visto que no está restringido a modelos *in vitro* (Cauwels et al., 2003; Perfettini and Kroemer, 2003). No sólo ocurre en circunstancias fisiológicas sino que puede ser inducida por ejemplo por TNF- α o fármacos. Existen varias formas de muerte celular programada que han sido denominadas como autofagia, paraptosis y catástrofe mitótica.

La autofagia se caracteriza por la formación de vesículas autofágicas que engloban gran cantidad de citoplasma y organelos y su consiguiente degradación por el sistema lisosomal propio de la célula (Shintani and Klionsky, 2004). La función exacta de la muerte celular por autofagia en mamíferos no está completamente aclarada (Okada and Mak, 2004).

La paraptosis está caracterizada por una formación de vacuolas citoplasmáticas que comienza con una progresiva turgencia de las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Se ha descrito que esta mediada por protein-quinasas mediadas por mitógenos y puede ser desencadenada por el miembro de la familia del receptor de TNF, TAJ/TROY (Wang et al., 2004) y por el insuline-like growth factor I receptor (Sperandio et al., 2004).

La catástrofe mitótica es otra ruta de muerte celular que no es apoptosis típica. Se produce por un fallo mitótico causado por un defecto en el control del ciclo celular y el desarrollo de células aneuploides que son condenadas a morir. Este proceso mata a la célula durante o cerca de la metafase de un modo independiente

de p53, pero se ha observado que va acompañada de permeabilización de la membrana mitocondrial y activación de caspasas. Aunque se ha intentado hacer una clasificación para su mejor entendimiento todas las rutas se solapan y comparten las rutas de señalización con lo cual es muy difícil establecer fronteras entre unas y otras. De hecho en una misma célula pueden aparecer marcadores de muerte tanto apoptóticos como necróticos simultáneamente, lo que indica que más de un programa de muerte celular puede estar activado al mismo tiempo. Aunque solo se hará efectivo el programa más rápido (**Castedo et al., 2004**).

Una proteína mitocondrial que contribuye, potencialmente, tanto a la muerte celular dependiente como independiente de caspasas es la endonucleasa G. Es una proteína conservada evolutivamente y es capaz de inducir la fragmentación del ADN de forma independiente de las caspasas en núcleos aislados. Otra proteína con papel pivotante es el apoptosis inducing factor (AIF) que funciona normalmente como oxidoreductasa pero que se transforma en un destructor celular cuando es liberado al citosol. Los efectos letales de AIF son controlados por la proteína de shock térmico, proteína 70 (**Ravagnan et al., 2001**).

La proteína lisosomal cathepsina D se ha observado que dispara la liberación de AIF en varias circunstancias. Además la presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk no previene la translocación mitocondrial-nuclear de AIF ni sus efectos letales, indicando que esta proteína está implicada en la ruta independiente de caspasas (**Broker, Kruyt, and Giaccone, 2005**). En células MCF-7 se ha observado que ciertos componentes de la vitamina D son capaces de desencadenar la muerte celular ejecutada por proteínas denominadas calpains en ausencia completa e independientemente de las caspasas. Esto indica que el retículo endoplasmático también puede intervenir en ciertos tipos de muerte celular independiente de caspasas (**Mathiasen et al., 2002**). La adhesión a la matriz extracelular a través de ciertas integrinas como $\alpha 5\beta 1$ puede estimular la expresión de Bcl-2 (**Matter and Ruoslahti, 2001**).

Existe una proteína que inhibe la transcripción de Bcl-2 y se denomina Bit-1. Durante la anoikis, Bit1 se transloca desde la mitocondria al citoplasma e interacciona con AES, un miembro y regulador negativo de la familia de reguladores transcripcionales Groucho/TLE. Esta interacción inicia la muerte celular programada independiente de la activación de caspasas (Jan et al., 2004).

Receptores de membrana celular que median la apoptosis y genes involucrados

Un avance importante para la investigación de la apoptosis se logró cuando se identificó un antígeno (Ag) de membrana celular capaz de inducir señales de apoptosis (Arango P., et al., 1997). Este receptor se denominó Fas o Apo-1, cluster de diferenciación (CD) 95, y es una proteína transmembrana tipo II glicosilada de aproximadamente 43 kD que se expresa constitutivamente en gran variedad de tejidos normales y líneas tumorales. El Fas/Apo-1 es miembro de la superfamilia del TNF, entre los que se encuentran los Receptores TNF tipo I y II, el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), CD40 y CD27. El papel de la interacción Fas/Apo-1 y su ligando en cáncer no está bien establecido; sin embargo, su papel en la apoptosis sugiere su participación como supresores del tumor. La activación de estos receptores TNF promueve la activación de la proteína FADD, un inductor de la activación de la caspasa 8. Esta molécula llevará a la activación de otras caspasas dando lugar al inicio de la muerte celular (**Figura 11**).

El **Bcl-2** (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) fue el primer protooncogen detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B (Aouacheria, A. et al. 2005). Durante la maduración de estas células puede ocurrir una traslocación cromosomal 14,18 en el gen Bcl-2; ello provoca aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis en células B y da por resultado la supervivencia de la célula transformada. Está demostrado que la sobreexpresión del gen bcl-2 en linfomas inducidos experimentalmente, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de

apoptosis. Este gen facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras aberraciones genéticas que pueden conducir a la progresión maligna. La expresión de este gen en algunos tipos de cáncer es un marcador de mal pronóstico. El gen bcl-2 forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula. Los miembros de la familia Bcl-2 están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X1, Bcl-Xs, Mcl-1. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Arango M. et al., 1997; Boise LH. et al., 1995).

Otros genes involucrados en la apoptosis

El gen p53 es un gen supresor de tumores, el cual actúa como uno de los principales inductores de la apoptosis. Ha sido llamado guardián del genoma por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Este bloqueo lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del ADN antes de que se replique (Arango M. et al., 1997). Este gen mantiene la integridad del genoma dado que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el ADN ha sido sustancial. En diversos tipos celulares incluyendo los linfocitos, la sobre-expresión de p53 conduce directamente a la apoptosis. Los genes c-myc y nur-77 a pesar de estar asociados con la progresión del ciclo celular participan en la inducción de apoptosis en algunas células (Arango M. et al., 1997; Boise LH. et al., 1995).

Activadores e inhibidores de la apoptosis

Siendo la apoptosis un proceso activo y estrictamente regulado, existen diversos activadores (citocromo c, samc/diablo, AIF, BIR3) y reguladores negativos

(IAP, Hsp, Bcl-2 y BclXL). La apoptosis puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas, lo que demuestra que, para su iniciación y progresión, son necesarias una serie de proteínas. El análisis genético del *C. elegans*, ha revelado la existencia de una serie de genes y proteínas implicadas en el control de la apoptosis.

La activación del apoptosoma se encuentra estrechamente controlada por proteínas de la familia Bcl-2 asociadas a la mitocondria, algunas de las cuales son apoptóticas y otras antiapoptóticas. Las células están protegidas frente a los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (relacionados con CED-9), los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma. Son factores antiapoptóticos la proteína Hsp70 y las IAP. La Hsp70 secuestra Apaf-1 y con ello impide la formación del apoptosoma, y las IAP que bloquean la actividad de las propias caspasas.

La inhibición de la apoptosis es importante en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos superiores. Durante el ciclo de vida normal la proteína inhibidora IAP, tiene una amplia capacidad *antiapoptótica* por silenciar la actividad de las caspasas. IAP fue identificada como proteína vírica que inhibe la muerte celular. Se caracteriza por poseer uno o más dominios muy conservados de 70 aminoácidos que contienen motivos de dedo de zinc, denominados repeticiones baculovíricas (BIR) esenciales para la actividad antiapoptótica. Existen unos cinco miembros de esta familia: CIAP1, cIAP2, XIAP, NAIP y survivina. Su acción es bloqueada por smac/diablo. El miembro prototipo de la familia Bcl-2 es un oncogén, identificado en leucemia humana de células B (B cell leukemia). Existen proteínas Bcl-2 proapoptóticas y antiapoptóticas, lo cual indica que miembros de la misma familia pueden actuar como oncogenes o como supresores de tumores. La familia Bcl-2 se divide en tres grupos según los dominios BH (Bcl-2 homology) que las integran:

1. Antiapoptóticas y oncogénicas, las que comparten homología de secuencia en los dominios BH1, BH2, BH3, y BH4. Ejemplos: Bcl-2 y Bcl-XL.

2. Proapoptóticas, las que comparten la homología de los dominios B1, B2 y B3. Ejemplos Bax y Bak.
3. Proapoptóticas, las que comparten la secuencia de homología solo en el dominio BH3. Ejemplos Bid, Bik y Bim.

Se ha demostrado que el dominio BH4 se requiere para la actividad apoptótica y que el dominio BH3 es esencial y suficiente para la actividad proapoptótica y supresora tumoral (**Figura 12**) (Cascales M., 2003).

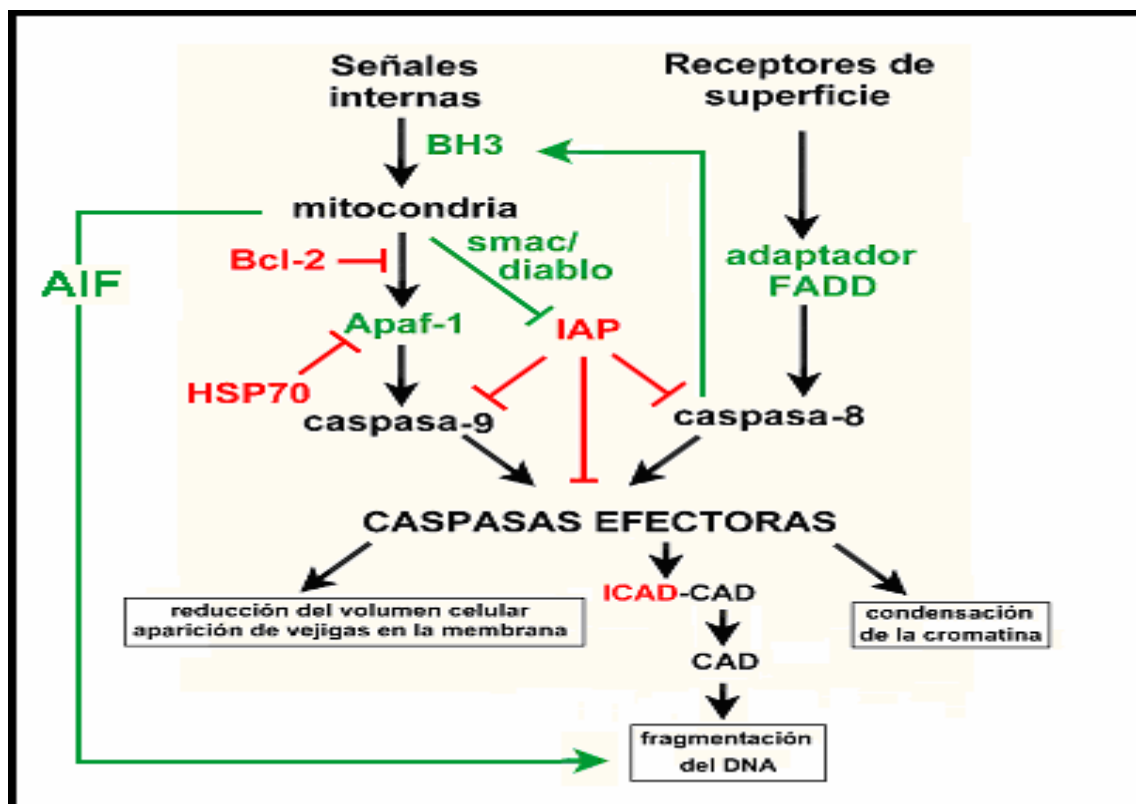


Figura 12. Las células están protegidas por los factores antiapoptóticos de la familia Bcl-2, los cuales limitan el reclutamiento de los componentes del apoptosoma, por la HSP70, que secuestra el dominio CARD de Apaf-1 y por IAP que actúa sobre las propias caspasas. La mitocondria inicia la cascada apoptótica liberando citocromo c, pero este efecto puede ser anulado si IAP mantiene su efecto inhibitorio sobre las

caspasas. La señal apoptótica tiene que ser sostenida por la liberación de Smac/diablo. Smac/diablo es la segunda proteína mitocondrial activadora de la caspasa que se une directamente a IAP y antagoniza su función. Un tercer activador de la apoptosis de procedencia mitocondrial es AIF, se traslada al núcleo donde interviene en la condensación de la cromatina (Cascales M., 2003).

Papel de la apoptosis en el sistema inmunitario

La muerte celular programada es muy importante para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario, debido a que interviene en los eventos de formación del repertorio de células T y B, en los mecanismos de tolerancia central y periférica, en la eliminación de células autorreactivas, en el establecimiento de la memoria inmunológica y en los mecanismos citolítico de células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos. Es conocido que el 95% de los timocitos son eliminados en el timo por mecanismos de apoptosis, proceso denominado selección negativa (delección clonal), el cual elimina la existencia de clones T autorreactivos. También en la médula ósea existe un proceso similar de delección de clones B, autorreactivos en el estadio B inmaduro por entrecruzamiento de las inmunoglobulina de superficie en ausencia de señales coestimuladoras. No obstante, la apoptosis no se restringe a las células inmaduras. También los linfocitos T maduros, bajo ciertas condiciones, pueden sufrir apoptosis, lo que corrobora su papel inmunorregulador. Entre los factores que pueden inducir apoptosis en células inmaduras están los glucocorticoides y las radiaciones gamma, la estimulación del complejo TCR/CD3 por anticuerpos monoclonales, Ags nominales y superantígenos y la estimulación de los receptores CD2, Fas/Apo-1 y TNF (Arango M. et al., 1997; Lossi y Merighi, 2003; Bernhardt R., 2004).

Funciones de la apoptosis

- **Eliminación de tejidos dañados o infectados**

La apoptosis ocurre cuando una célula se encuentre dañada y no tiene posibilidades de ser reparada, o cuando ha sido infectada por un virus. La decisión de iniciar la apoptosis puede provenir de la célula misma, del tejido circundante o de una reacción proveniente del sistema inmunitario. Cuando la capacidad de una célula para realizar la apoptosis se encuentra dañada (por ejemplo, debido a una mutación), o si el inicio de la apoptosis ha sido bloqueado (por un virus), la célula dañada puede continuar dividiéndose sin mayor restricción, resultando en un tumor que puede ser de carácter canceroso. Por ejemplo, como parte del “secuestro” del sistema genético de la célula llevado a cabo por los virus del papiloma humano (VPH), un gen denominado E6 se expresa originando un producto que degrada la proteína P53, vital para la ruta apoptótica.

- **Homeostasis**

En un organismo adulto, la cantidad de células que componen un órgano o tejido debe permanecer constante, dentro de ciertos límites. Las células de la sangre y de la piel, por ejemplo, son constantemente renovadas por sus respectivas células progenitoras. Por lo tanto, esta proliferación de nuevas células tiene que ser compensada por la muerte de otras células. A este proceso se le conoce como homeostasis, aunque algunos autores e investigadores han sugerido homeocinesis como un término más preciso y elocuente. La homeostasis se logra cuando la relación entre la mitosis y la muerte celular se encuentra en equilibrio. Si este equilibrio se rompe, pueden ocurrir dos cosas: Las células se dividen más rápido de lo que mueren, desarrollando un tumor o las células se dividen más lentamente de lo que mueren, produciéndose un grave trastorno de pérdida celular. Ambos estados pueden ser fatales o potencialmente dañinos.

- **Regulación del sistema inmunitario**

Ciertas células del sistema inmunitario, los linfocitos B y linfocitos T, son sofisticados agentes de la respuesta defensiva del organismo frente a infecciones así como células propias que hayan adquirido o desarrollado algún tipo de malignidad. Para llevar a cabo su trabajo, las células B y T deben tener la habilidad de discriminar lo

propio de lo extraño y lo sano de lo enfermo, gracias a la especialidad de sus receptores. De hecho, los linfocitos T citotóxicos pueden ser activados por fragmentos de proteínas expresadas inapropiadamente (derivadas, por ejemplo, de una mutación maligna) o por antígenos extraños producidos como consecuencias de una infección intracelular. Después de activarse tienen la capacidad de migrar, proliferar y reconocer las células afectadas, induciendo una respuesta de muerte celular programada.

Apoptosis y enfermedad

Diversas enfermedades están asociadas con la inapropiada regulación de la apoptosis (**Tabla I**). Estas enfermedades pueden dividirse en dos grandes grupos: el que presenta aumento de la supervivencia celular (asociado con la inhibición de la apoptosis) y otro en el que hay un exceso de muerte celular (sobreactivación de la apoptosis). Las enfermedades en las que hay un aumento excesivo de células, incluyen al cáncer, infecciones virales y las enfermedades autoinmunes que permiten la persistencia de células B y T autorreactivas. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y los trastornos neurodegenerativos como Alzheimer son ejemplos de un exceso de apoptosis (Ortega et al., 2001).

Tabla I. Enfermedades asociadas con la inducción e inhibición de la apoptosis

Inhibición de la apoptosis	Incremento de la apoptosis
Cáncer Colorrectal Glioma Linfoma folicular Carcinomas con mutaciones de p53	Enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer Parkinson Esclerosis lateral amiotrófica Rinitis pigmentosa Epilepsia
Tumores dependientes de hormonas: Cáncer de mama Cáncer de próstata Cáncer de ovario	Sistema hematopoyético: Anemia aplásica Linfocitopenia T CD4+ Deficiencia de G6PD (monocitos)
Enfermedades autoinmunes: Lupus eritematoso sistémico Miastenia gravis	Daño a órganos: Diabetes mellitus tipo 1 Pancreatitis alcohólica Daño isquémico (miocardio, retina, Cerebro, riñón)
Infecciones virales Herpesvirus Poxvirus Adenovirus	Sida

Apoptosis e infecciones virales

La apoptosis como resultado de las infecciones virales considera, al menos en parte, responsable de las patologías asociadas con este tipo de infecciones. Por lo general, los virus poseen mecanismos para bloquear la apoptosis prematura de las células infectadas, propiciando establecer y mantener la infección, o bien prolongar la vida de las células infectadas lícitamente, de modo que se asegure la máxima replicación viral. Por ejemplo, el establecimiento de una infección efectiva por adenovirus depende de la función de la proteína E1B19K, un homólogo viral de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Young SL et al., 1997; Fadeel B. et al., 1999; Ortega et al., 2001). Además, estas estrategias virales antiapoptóticas pueden también contribuir a la patogénesis de la infección viral y en situaciones extremas, promover la capacidad oncogénica de ciertos virus (Young SL et al., 1997; Ortega et al., 2001).

Los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) presentan una disminución de las células T cooperadoras CD4⁺ y una destrucción del sistema inmunitario que conduce al desarrollo del sida (**Finkel et al., 1998; Ortega et al., 2001**). Los estados tempranos de la enfermedad están caracterizados por una severa disregulación del sistema inmunitario, que afecta el número y la funcionalidad de las células T CD4⁺ y CD8⁺. Originalmente se creyó que los efectos citolíticos del virus eran los responsables de la pérdida de las células T. Sin embargo, este hecho no afecta la disminución de otros tipos celulares en los individuos infectados con sida. Se ha observado que estos pacientes presentan un aumento en los niveles séricos de las citocinas que promueven la muerte celular apoptótica como TNF- α , IFN- γ e IL-10, y una disminución de la interleucina 12 que previene la muerte, lo que pudiera promover la susceptibilidad de las células T a la apoptosis. Además de que TNF α e IFN γ favorecen la expresión de Fas y de su ligando en las células T CD4⁺ y CD8⁺, esto apoya la idea de la participación del sistema Fas/FasL en la depleción de los linfocitos T CD4⁺ en el sida. Por otro lado, los individuos infectados con el virus del sida presentan niveles bajos de glutatión reducido y de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso lo que conduce a estrés oxidativo, por la acumulación de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo aumenta la expresión del ligando de Fas y por lo tanto la tasa de apoptosis (**Finkel et al., 1998; Orrenius et al., 1995; Ortega et al., 2001**).

Durante el desarrollo neuronal temprano normalmente ocurre la apoptosis con la posibilidad de ser iniciada nuevamente durante el envejecimiento por diversos estímulos, al promover la exclusión de un número significativo de neuronas (**Gorman et al., 1998; Tapia et al., 1998; Ortega et al., 2001**). En condiciones fisiológicas, la supervivencia neuronal y la apoptosis son controladas principalmente por dos tipos de receptores de superficie celular que responden a señales extracelulares, las moléculas Tkr (familia de receptores de tirosinas cinasas) y p75 (receptor de neurotrofinas), ambos comprometidos en la supervivencia neuronal, diferenciación e implicados en la apoptosis neuronal respectivamente. Estos estímulos son transmitidos a través de vías intracelulares que finalmente son procesadas por dos

grupos de genes, los proapoptóticos que codifican para el grupo de proteínas de las caspasas y los antiapoptóticos como Bcl2 y Bcl-xL (Faddeel B. et al., 1999; Strasser et al., 1996; Ortega et al., 2001). Un ejemplo de las alteraciones neurodegenerativas es la enfermedad de Alzheimer, que se presenta en individuos mayores de 65 años con una incidencia de 12%, este porcentaje se incrementa hasta 45% en personas de 85 años. La enfermedad se caracteriza por pérdida de la memoria y alteraciones de la personalidad. El menoscabo de las funciones cerebrales estriba en la interrupción de las sinapsis y en la ausencia de las neuronas que realizan las sinapsis (Tapia et al., 1998; Cotman et al., 1998; Ortega et al., 2001).

Las últimas investigaciones sugieren que la pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer, al menos en parte, es causada por mecanismos apoptóticos. Se ha propuesto que los estímulos apoptóticos iniciales dañan o destruyen los procesos neurales (neuritis) por iniciación local de la muerte. Dichos eventos desconectan los circuitos neurales y colocan a las neuronas en riesgo apoptótico, ocasionado por la pérdida de factores tróficos, y a otros procesos que contribuyen al mantenimiento de las funciones neuronales. La acumulación del péptido β -amiloide ha sido involucrada como factor causal de la neurodegeneración en la enfermedad de Alzheimer (Hetts, 1998; Ortega et al., 2001). Se ha demostrado que el péptido β -amiloide induce apoptosis neuronal en cultivo y que puede ser un sustrato para las caspasas (Donohower et al., 1992; Ortega et al., 2001). Además los depósitos insolubles del péptido β -amiloide inducen estrés oxidativo (principalmente lipoperoxidación), alteraciones de las funciones mitocondriales, lo que modifica el metabolismo energético y la homeostasis iónica (calcio) al alterar el funcionamiento de la ATPasa y de los transportadores de glucosa y glutamato; aumentando la susceptibilidad de las neuronas a la muerte por apoptosis (Strasser et al., 1996; Cotman et al., 1998; Ortega et al., 2001).

Por otro lado, se sabe que las proteínas p53 y p21 promotoras de apoptosis inhiben la producción de la proteína presenilina I (PSI), sugiriendo que las presenilinas tienen propiedades antiapoptóticas. Las presenilinas constituyen

también un sustrato para las caspasas, lo que conduce a la pérdida de sus propiedades antiapoptóticas (Cotman et al., 1998; Ortega et al., 2001). Probablemente, el péptido β -amiloide es el agente causal de la enfermedad de Alzheimer, donde las mutaciones de las presenilinas junto con la activación de las caspasas neuronales actúan para incrementar los niveles patológicos de este péptido, lo que quizá propicie un incremento en el grado de destrucción apoptótica de las neuronas (Gorman et al., 1998; Fadeel et al., 1999; Cotman et al., 1998; Ortega et al., 2001).

Cabe destacar que estudios *in vitro* e *in vivo* destacan que la apoptosis es una de las consecuencias más importantes de la infección por virus dengue (DENV) y es considerado como una característica importante de la patogénesis viral (Marianneau et al., 1998; Viera et al., 2005). Así mismo, demostraron que la replicación del virus dengue induce apoptosis en neuronas de ratones y hepatocitos humanos y que la habilidad de activar esta vía depende tanto de determinantes virales como celulares. De hecho, las células citotóxicas activadas durante la respuesta inmunitaria antiviral y la activación de células fagocíticas asociadas con la producción de citocinas pueden causar daño tisular local o desbalances transitorios en la homeostasis. Además, la apoptosis inducida por el DENV puede ser considerada como una característica importante de la patogénesis viral (Marianneau et al., 1998; Viera et al., 2005).

Espina et al., (2003), observaron apoptosis incrementadas con concentraciones elevadas de TNF- α , por lo que esta citocina pudiera estar involucrada de forma autocrina o paracrina en la inducción de apoptosis, y este evento puede ser considerado como una característica importante en la patogénesis viral.

Paternóster et al., (2009), indican que la MLT ejerce un efecto complejo sobre la apoptosis celular. El modelo actual implica una actividad pro-apoptótica en células tumorales y anti-apoptótica en células normales. La base para esta selectividad se presume ser la habilidad de la MLT para estimular la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) en células tumorales. Evaluaron el efecto de la MLT en tres tipos de linfocitos humanos: linfocitos sanguíneos normales, linfoma de Burkitt

(BLA1), y el descendiente del virus Epstein-Barr (EBV) convertido en E2r. Demostraron que la MLT protege BLA1 de apoptosis en la misma manera como los linfocitos normales, mientras que E2r no son afectados. Estos resultados muestran que la producción de ROS no está limitada para los linfocitos tumorales ni para la promoción de apoptosis; la MLT no promueve apoptosis en linfocitos tumorales, pero EBV inhibe los efectos anti-apoptóticos de la MLT y éste efecto no depende en las bien reconocidas propiedades químicas antioxidantes de la MLT.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La Encefalitis Equina Venezolana (EEV) es una enfermedad que afecta a équidos y humanos provocando una marcada morbimortalidad. Es causada por un virus del género *Alfavirus* que solo se encuentra en la región de las Américas. Este virus se transmite a los humanos por la picadura de un mosquito infectado y ocasionalmente puede causar epizootias y epidemias, representando en Venezuela un problema relevante de salud pública. Además, en el sistema productivo, la EEV ha generado cuantiosos daños económicos por la inducción de muerte o sacrificio de animales de la cabaña equina.

La infección por el virus de EEV genera una respuesta inflamatoria sistémica y por su tropismo y afectación del sistema nervioso central (SNC) puede ocasionar daños con secuelas muchas veces irreversibles. Los mecanismos patogénicos se han asociado con su acción citopática directa sobre las células del SNC e indirecta a través de la inducción de una respuesta inmunitaria inflamatoria. A su vez, la adecuada funcionalidad del sistema inmunitario es capaz de evitar la progresión de la infección y proteger de la lesión neurológica. En los individuos que sobreviven, el sistema inmunitario es capaz de controlar la infección con inducción de un daño inflamatorio de intensidad variable.

Debido a la relevancia que el sistema inmunitario tiene en la patogénesis de la infección por el virus de EEV, es posible que aquellas moléculas que modulan su actividad reguladora y/o efectora pudieran poseer acciones terapéuticas. La función del sistema inmunitario está regulada por diferentes mecanismos entre los que se incluyen los de origen neuroendocrino. La melatonina (MLT), es una hormona que posee un efecto regulador directo sobre diversas poblaciones linfocitarias, células presentadoras de antígeno, y sobre la respuesta inmunitaria inflamatoria como la producida por algunos arbovirus tales como los virus Semliki Forrest y West Nile. Sin embargo, a pesar de las relevantes propiedades atribuidas a la MLT, no se ha dilucidado si el mecanismo de acción en estas infecciones virales, es por un efecto directo sobre el virus o si, por el contrario, su acción es indirecta, mediada por la

estimulación de células inmunocompetentes, posiblemente con participación de los receptores de MLT que presentan estas células.

Por otro lado, se considera como una característica importante de la patogénesis viral, la inducción de muerte celular programada o apoptosis. Este fenómeno es de especial relevancia en la inducción de patología neurológica. En base a estos antecedentes, se plantea investigar el posible efecto terapéutico de la MLT sobre la apoptosis y activación de la microglia en la infección por el virus de EEV tanto *in vivo* como *in vitro*, hallazgo que constituye el objetivo de la presente investigación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la MLT sobre la apoptosis y activación de la microglia en modelos experimentales de la infección por el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la tasa de sobrevivencia en ratones infectados por el virus de EEV, sometidos a diferentes esquemas de carácter preventivo y de tratamiento precoz o tardío con MLT.
2. Examinar la activación de la microglia en el tejido cerebral de ratones infectados por el virus de EEV y tratados o no con MLT a diferentes estadios post- infección.
3. Determinar la inducción de apoptosis en células de neuroblastoma y en cerebros de ratones infectados por el virus EEV y tratados o no con MLT en diferentes estadios post- infección.
4. Establecer un posible mecanismo de acción terapéutico de la MLT en la infección por el virus EEV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Virus

El stock de virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) utilizado para los experimentos *in vivo* fue preparado en cultivo de células Vero (riñón de mono verde africano) el cual contenía $6,8 \times 10^7$ unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml). Los animales fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con 0,05 ml conteniendo 10 DL₅₀ de la cepa Guajira del virus de EEV (Bonilla et al., 1997), diluida en solución borato-salina con albúmina bovina al 0,4% estéril (BABS) (Hammon et al., 1969). La DL₅₀, que se inyectó a los ratones, se calculó por el método de Reed-Muench (1938).

Para los ensayos *in vitro*, se utilizaron las células de neuroblastoma múrido (Na₂) las cuales se infectaron con el virus de EEV a una concentración de 1×10^{-6} UFP/ml a un MOI (multiplicity of infection) de 1 en un volumen final de 300 μ l por 2, 4 y 6 horas, las cuales fueron cultivadas en platos de cultivo de 24 pozos con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) (SIGMA-ALDRICH® St. Louis, USA) suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico, 10% de suero fetal bovino, en atmósfera de 5% de CO₂ y a 37°C con movimientos intermitentes de la placa.

MLT

Se utilizó MLT (Research Biochemical Internacional, MA, USA) diluida en solución salina fosfatada (PBS) estéril, a una dosis de 250 y 500 μ g por kilogramo de peso (μ g/Kg.) para el tratamiento *in vivo* de los animales, inoculada por vía subcutánea en volumen de 0,25 ml (Bonilla et al., 1997). Estas dosis se usaron para determinar la dosis óptima de sobrevida. Los animales se inyectaron dos horas antes de oscurecer comenzando desde los 3 días previos y durante los 10 días posteriores después de la inoculación viral (Ben-Nathan et al., 1995). La MLT fue inyectada en ese tiempo para asemejar su biosíntesis pineal, ya que su síntesis y secreción sigue un ritmo circadiano y ocurre durante la activación nocturna de los receptores pineales β -adrenérgicos y cuya función principal es actuar como transductor de la influencia del ciclo luz-oscuridad sobre la fisiología del cuerpo (Maestroni et al., 1986).

Posterior al ensayo de sobrevida se utilizó la concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de MLT para todos los ensayos *in vivo* (Bonilla et al., 1997).

Para los ensayos *in vitro* con células Na_2 se utilizaron dosis de MLT de 0,025; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 y 1,8 mM (Noda et al., 1999). Posterior a los resultados obtenidos con los ensayos de Óxido Nítrico (NO) y Malondialdehído (MDA) se utilizaron las concentraciones de 0,1mM; 0,5mM y 1,0mM de MLT para los ensayos *in vitro* subsiguientes con células Na_2 (Valero et al., 2006).

SISTEMA *IN VIVO*

Animales

Se utilizaron ratones machos NMRI albinos obtenidos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), con un rango de peso de 25 a 30 gramos, alimentados “ad libitum” con Ratarina® (Purina, Venezuela) y agua filtrada, mantenidos en ambiente de temperatura de 24 °C bajo ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Los animales fueron agrupados en número de 15-20 por jaula y distribuidos en los siguientes grupos experimentales: a) controles, tratados con solución salina fosfatada (PBS) estéril y sometidos a las mismas condiciones, b) tratados con 250 y 500 μg de MLT/Kg. de peso corporal, c) infectados con el virus de EEV y d) infectados y tratados con 250 y 500 μg de MLT/Kg.

ENSAYOS *IN VIVO*

Para los ensayos de sobrevida los ratones se inocularon por vía sub- cutánea con 0,25 ml de las dosis señaladas de MLT con administración diaria, según los siguientes esquemas de tratamientos: **Preventivo y Precoz**: desde los 3 días previos y durante los 10 días posteriores después de la inoculación viral. **Tratamiento Precoz**: infectados e inmediatamente después tratados con la MLT durante los 10 días siguientes. **Tratamiento Tardío**: infectados con el virus y tratados con MLT 24 horas después de la infección viral de forma diaria hasta los 10 días. La MLT fue inyectada dos horas antes de oscurecer (entre 5:00 y 6:00 pm) (Ben-Nathan et al.,

1995). El grupo control estuvo formado por ratones infectados y sin tratamiento con MLT, sometidos a las mismas condiciones.

Recolección de muestras

Los animales se sacrificaron a diferentes periodos de post infección (p.i.) en número de cinco por cada grupo experimental por ensayo. La recolección de sangre completa se hizo del seno orbital (ángulo interno del ojo) en tubos sin anticoagulante para la obtención del suero, y posterior determinación de anticuerpos IgM anti EEV. Inmediatamente a la recolección de sangre se extrajo el cerebro de los animales de cada grupo, previa perfusión con solución salina por vía intracardiaca. A los cerebros se les determinó activación de la microglia y apoptosis.

Determinación de anticuerpos IgM anti - EEV

En los ratones sobrevivientes infectados con el virus y que recibieron cada uno de los tratamientos, se determinó la producción de anticuerpos específicos contra el virus de EEV (IgM); para esto se utilizó la técnica de ELISA de fase sólida descrita por **Rosato et al. (1988)**, la cual consiste en sensibilizar la placa de 96 pozos con un anticuerpo anti IgM de ratón (específico anticadena μ) (SIGMA Chemical Co, Mo, USA). Después de un paso de bloqueo, las placas fueron lavadas cinco veces; luego se añadieron las muestras de suero diluidas con PBS desde 1:20 hasta 1: 10240. Se incubaron a temperatura ambiente por dos horas, después de las cuales se añadió el antígeno viral (TC-83-EEV). Se incubó por una hora a 37°C y se añadió un anticuerpo (anti IgG de ratón) marcado con la enzima peroxidasa, que al reaccionar sobre el sustrato ABTS (2,2´azino diethylbenzthiazoline sulfato), produjo una reacción colorimétrica que fue detenida con NaOH 3M y leída en un espectrofotómetro automático de placas a 405 nm (Microlector de ELISA Microwell System Reader 530 Organon Teknika Co.). En cada ensayo se incluyeron sueros controles positivos y negativos.

Determinación de la activación de la microglía.

Selección del tejido y cortes

Se estudiaron los cerebros de los ratones de los diferentes grupos ensayados. Se colocó una muestra de tejido en formalina durante 4 horas y se almacenó a 4°C; transcurrido el tiempo se lavó con PBS, a pH 7.4. Luego los tejidos se incluyeron en parafina; seguidamente, se realizaron cortes o rebanadas de 4 µm de grosor, utilizando un micrótopo (Marca: SHANDON, Modelo: HM505N) cuidando la integridad del tejido. Después fueron tomados los cortes con un pincel fino, y colocados en láminas porta objeto con previa identificación y por triplicado. Finalmente se siguió con el protocolo para cortes parafinados y anticuerpos (Quiroz et al., 2008).

Determinación del CD-200

Para la identificación de las células activadas de la microglía en los cortes de cerebros de ratones, se utilizó el método de inmunohistoquímica indirecta. Para ello, se utilizó el anticuerpo monoclonal hecho en rata anti CD-200 de ratón (SEROTEC Inc., NC, USA), a una dilución de 1:200 en PBS a pH 7.4, durante toda la noche a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Luego se realizó un lavado con PBS y se agregó un segundo anticuerpo hecho en conejo F (ab´)2 anti IgG de rata marcado con peroxidasa (SEROTEC Inc., NC, USA), a una dilución 1:200 por una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Como control se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata, contra un antígeno humano con igual isotipo. Las células de la microglía activadas mostraron una coloración marrón al ser observadas bajo un microscopio de luz (Modelo 872E, Carl Zeiss) el cual tiene incorporado un sistema de cámara fotográfica digital. Los resultados fueron expresados como células CD200 positivas por mm², en muestras por triplicado del 1^{ero}, 3^{ero} y 5^{to} día p.i., con un total de tres ensayos realizados.

Método de detección de apoptosis por la técnica de TUNEL.

En los cortes de cerebros de ratones y en las células provenientes de Na₂ se detectaron las células apoptóticas. Para ello se utilizó el kit de detección de apoptosis Apop Tag[®] Peroxidasa *In Situ* de la casa comercial Chemicon Internacional (USA & Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante, el principio consiste en la modificación de fragmentos de ADN utilizando la deoxynucleotidil terminal transferasa (TdT) en los extremos 3´OH del ADN para el marcaje de células apoptóticas. Los núcleos apoptóticos positivos mostraron una coloración marrón al ser observado bajo un microscopio de luz (Modelo 872E, Carl Zeiss) el cual tiene incorporado un sistema de cámara fotográfica digital. Los resultados *in vivo* fueron expresados como células TUNEL positivas por mm² en muestras por triplicado del 1^{ero}, 3^{ero} y 5^{to} día p.i. con un total de tres ensayos realizados y los *in vitro* se expresaron como porcentaje (%) de células TUNEL positivas/total de 100 células a las 2, 4 y 6 horas p.i.

SISTEMAS *IN VITRO*

Cultivo de células de neuroblastoma múrido (Na₂)

Se utilizaron células Na₂ obtenidos del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (Caracas-Venezuela), a una concentración de 1x10⁶ células x ml de suspensión celular, las cuales fueron cultivadas en platos de cultivo de 24 pozos a razón de 300 µl/pozo estimando una población celular de 3x10⁵ células/pozo, con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) (SIGMA-ALDRICH[®] St. Louis, USA) suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico, con 10% de suero fetal bovino y en atmósfera de 5% de CO₂.

ENSAYOS *IN VITRO*

En cada uno de los pozos de la placa que contenían las monocapas formadas por células Na₂, se colocó el virus de EEV y la MLT a las concentraciones previstas, según el esquema de trabajo establecido para un total de tres ensayos por esquema de tratamiento durante 2, 4 y 6 horas post-infección (Valero et al., 2006). A las células control no se les colocó virus ni MLT y fueron sometidas a las mismas condiciones del ensayo. A los cultivos se les determinó apoptosis según esquemas de tratamientos: Preventivo y Precoz, Precoz y Tardío.

Cuantificación de Óxido Nítrico (NO)

La formación de NO se determinó a partir de la detección de nitratos/nitritos en sobrenadante de cultivos de células de Na₂ a las 6,12, 24 y 48 horas de post-infección con un total de tres ensayos realizados, utilizando el kit de análisis de óxido nítrico Quantichrom™ de la casa comercial Bioassay Systems (Haywards, USA). La determinación se realizó mediante un ensayo de diazotización, basado en la reacción de Griess. La prueba se fundamenta en que los nitritos y el ácido sulfanílico interactúan con N-(1-naftil)-etilendiamina, generando un producto que es fácilmente monitoreado por espectrofotometría a 550nm (Wu et al., 2001). Los valores fueron expresados en µM/L (Lahiri, et al., 1999; Noda, et al., 1999).

Determinación de Malondialdehído (MDA)

La determinación de MDA se llevó a cabo por el método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) que comprende inicialmente una etapa de precipitación proteica, en la cual se incorpora inicialmente el ácido tiobarbitúrico que produce una reacción directa con la fracción de MDA presente en la muestra; luego se agrega una mezcla de butanol-piridina que separa la muestra en tres fases: una proteica, una lipídica y una acuosa. La coloración desarrollada en la reacción es directamente proporcional a la concentración de MDA, la cual es medida contra un blanco reactivo a 532 nm.

Los datos obtenidos se interpretaron en una curva estandarizada para el cálculo de la concentración, expresada en nmol/L (Sonnerborg, et al., 1988).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se representan como promedios \pm desviación estándar (DE) y se analizaron mediante Ji cuadrado, curvas de sobrevida y análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni, según el caso. El criterio para la significancia estadística fue de $p < 0,05$. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism 5.0.

IV. RESULTADOS

Evaluación del efecto protector *in vivo* de diferentes dosis de MLT en la infección por EEV

Para establecer las dosis óptimas de MLT como agente terapéutico en EEV se analizó el efecto de la administración preventiva durante 3 días antes de la inoculación viral y durante los 10 días siguientes. Al día 6 después de la inoculación viral la tasa de mortalidad del grupo de ratones infectados no tratados fue del 100% (10 DL₅₀ /ratón) en relación a la mortalidad observada en los ratones tratados con 250 y 500 µg de MLT /Kg. de peso que fue de 45 y 40% respectivamente. Además, el tratamiento con MLT retrasó el inicio de la enfermedad y prolongó el tiempo de muerte en los ratones tratados (6 días vs. 8 días) (Tabla 2).

TABLA 2.- EFECTO DE LA MLT SOBRE LA TASA DE SOBREVIVENCIA DE RATONES DESPUÉS DE SER INOCULADOS CON EL VIRUS DE EEV

Tratamiento	Muertos/Total	% Muertos	Días promedio de muerte
EEV	25/25	100	6
EEV + 250 µg MLT/Kg.	9/20	45*	8
EEV + 500 µg MLT/Kg.	10/25	40*	10

La MLT fue inyectada vía subcutánea diariamente entre 5-6 p.m., comenzando 3 días antes y continuando hasta 10 días después de la inoculación viral. *p<0,05 comparado con los ratones infectados al sexto día después de la inoculación del virus.

Por lo tanto, posterior al ensayo de sobrevivencia se utilizó como concentración óptima 500 µg/Kg de MLT para todos los ensayos *in vivo* (Bonilla et al., 1997).

Evaluación del efecto protector de la MLT en la infección por EEV utilizando diferentes esquemas de tratamiento

Para los ensayos *in vivo*, la MLT se utilizó a la dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día y se administró a ratones por vía subcutánea. Los ratones fueron sometidos a tres esquemas de tratamiento con MLT: a) **Preventivo y Precoz**: desde los 3 días previos y durante los 10 días posteriores a la inoculación viral. **Tratamiento Precoz**: infectados e inmediatamente después tratados con la MLT durante los 10 días siguientes. **Tratamiento Tardío**: infectados con el virus y tratados con MLT 24 horas después de la infección viral de forma diaria hasta los 10 días. En los ratones que siguieron el esquema de tratamiento preventivo y precoz, se observó que a los días 6 y 7 después de la inoculación viral la tasa de mortalidad fue de 25% y 45% respectivamente, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al 50% y 100% de la mortalidad observada al sexto y séptimo día en el grupo control de ratones infectados con EEV. Además, el tratamiento con MLT retrasó el inicio de la enfermedad y prolongó el tiempo de vida en los ratones tratados (Figura 13).

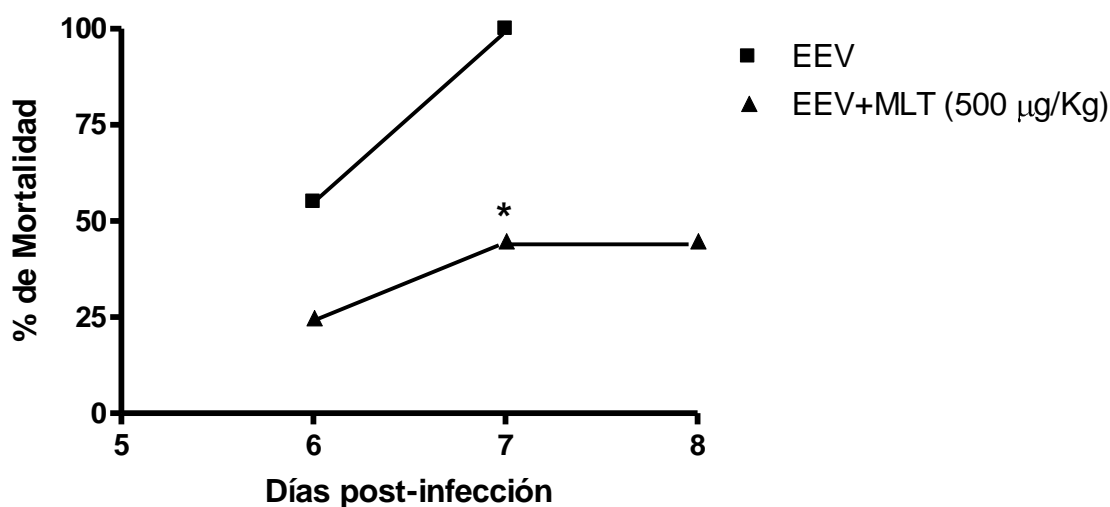


Figura 13. Tasa de mortalidad en ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) y con tratamiento preventivo y precoz con MLT. Los ratones albinos machos fueron infectados intraperitonealmente con 10DL_{50} de la cepa Guajira del virus de EEV. La MLT (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) fue administrada diariamente, 3 días antes de la inoculación viral y 10 días después. * $p < 0,05$ comparado con el grupo de ratones infectados con EEV al séptimo día.

En el grupo de ratones que siguieron el esquema de tratamiento precoz, es decir, infectados con el virus de EEV e inmediatamente tratados con MLT, se evidenció que la tasa de mortalidad al sexto día era similar a la observada en los ratones no tratados. Sin embargo, al séptimo día la mortalidad en los ratones tratados fue de 75% que es significativamente inferior ($p < 0,05$) a la observada en el grupo control con el 100% de mortalidad (Figura 14).

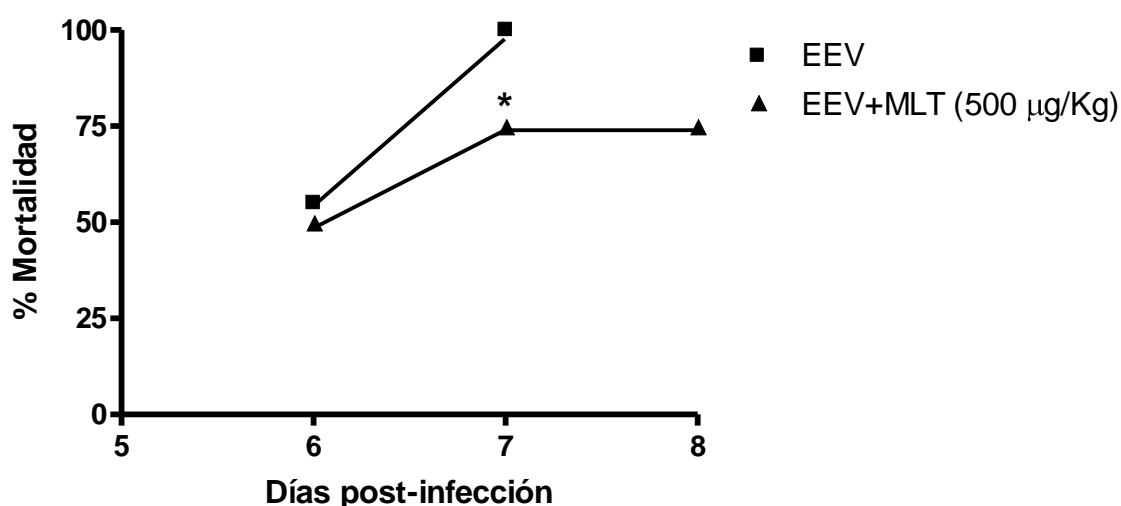


Figura 14. Tasa de mortalidad en ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) y con tratamiento precoz con MLT. Los ratones albinos machos fueron infectados intraperitonealmente con $10DL_{50}$ de la cepa Guajira del virus de EEV. La MLT ($500 \mu\text{g/Kg}$) fue administrada simultáneamente con la infección viral. * $p < 0,05$ comparado con el grupo de ratones infectados con EEV al séptimo día.

En relación a la tasa de mortalidad de los ratones que siguieron el esquema de tratamiento tardío (infectados con el virus y tratados desde las 24 horas después de la infección viral de forma diaria hasta los 10 días) no se observaron diferencias significativas al compararlo con el grupo de ratones infectados (Figura 15). La tasa de mortalidad fue de 100% en ambos grupos al 7^{mo} día p.i.

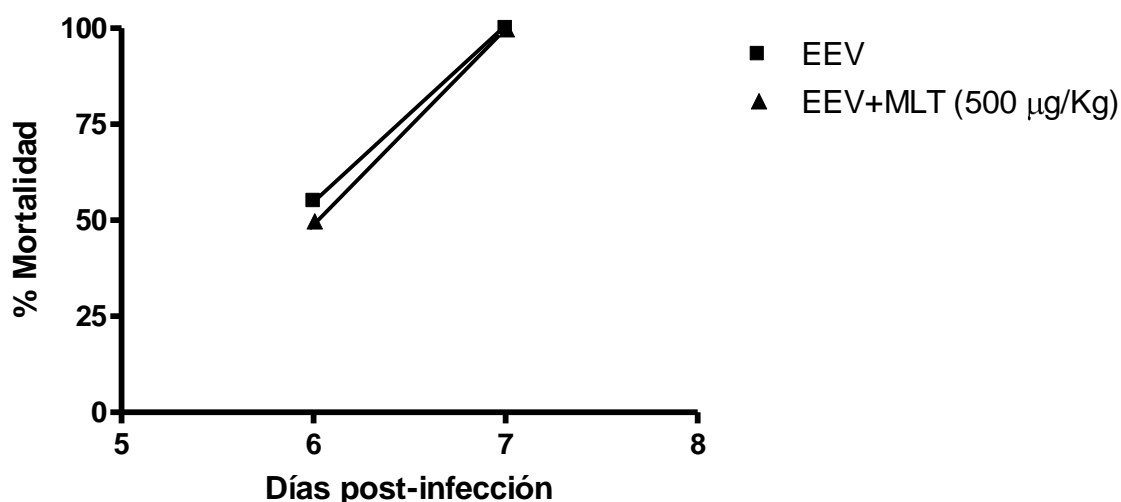


Figura 15. Tasa de mortalidad en ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) y con tratamiento tardío con MLT. Los ratones albinos machos fueron infectados intraperitonealmente con 10DL₅₀ de la cepa Guajira del virus de EEV. La MLT (500 µg/Kg) fue administrada 24 horas después de la infección viral.

En los ratones que siguieron el esquema de tratamiento preventivo y precoz, se observó que al 6^{to} día después de la inoculación viral, la tasa de supervivencia fue de un 75%, mientras que los de tratamiento precoz, tratamiento tardío y grupo control (EEV) mostraron un 50% de supervivencia. Al 7^{mo} día se evidenció que el resto de los ratones (100%) del grupo control y los que siguieron el esquema de tratamiento tardío con MLT murieron, observándose un 25% de ratones vivos en los de tratamiento preventivo y precoz con MLT y tratamiento precoz; terminando el ensayo con un 25% de supervivencia para ambos grupos, mostrando diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al grupo control de ratones infectados por EEV. La MLT prolongó el tiempo de vida en los ratones tratados preventiva y precozmente (Figura 16).

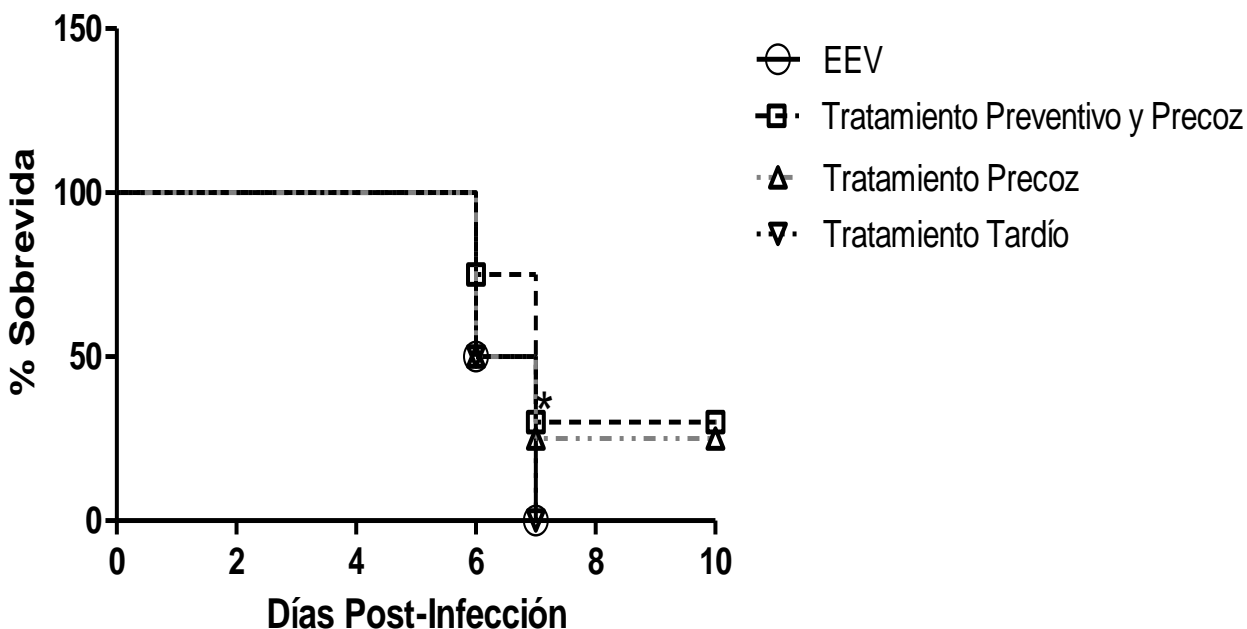


Figura 16. Curva de sobrevivência em ratões infectados com o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (EEV) utilizando diferentes esquemas de tratamento com melatonina. Os ratões albinos machos foram infectados intraperitonealmente com 10DL₅₀ de la cepa Guajira del virus de EEV. La MLT (500 µg/Kg) fue administrada: 3 días antes de la inoculación viral (tratamiento preventivo y precoz), simultáneamente después de la infección (tratamiento precoz) y 24 horas después de la infección (tratamiento tardío). *p<0,001 entre los grupos de tratamiento preventivo y precoz y tratamiento precoz cuando se compararon con el control.

Los títulos de anticuerpos IgM anti EEV, en los ratões sobreviviente tratados con 500 µg/kg de peso de MLT, fueron muy altos ubicándose dentro de un rango de 1: 2560 a 1: 5120 y de 1: 640 a 1: 1280, a las 3 y 7 semanas después de la inoculación del virus, respectivamente.

Evaluación del efecto de la MLT sobre la activación de la microglía en la infección por el virus de EEV

Investigamos el efecto del tratamiento de la MLT sobre la activación de la microglía cerebral de ratones infectados con el virus de EEV. Para investigar este efecto de MLT escogimos el mejor régimen terapéutico, que es el empleo preventivo y precoz con respecto a la inoculación del virus. Los animales se sacrificaron al 1^{er}, 3^{er} y 5^{to} día de seguimiento posterior a la infección.

Al 1^{er} día post- infección se detectó un incremento significativo ($p < 0,001$) en el número de células activadas de la microglía en el grupo de ratones con EEV ($9,667 \pm 1,528$) con respecto a los otros grupos: control ($4,333 \pm 0,577$); MLT ($1,667 \pm 1,155$); y MLT+EEV ($2,667 \pm 0,577$), mientras que se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) en el grupo tratado no infectado con respecto al grupo control (Figura 17).

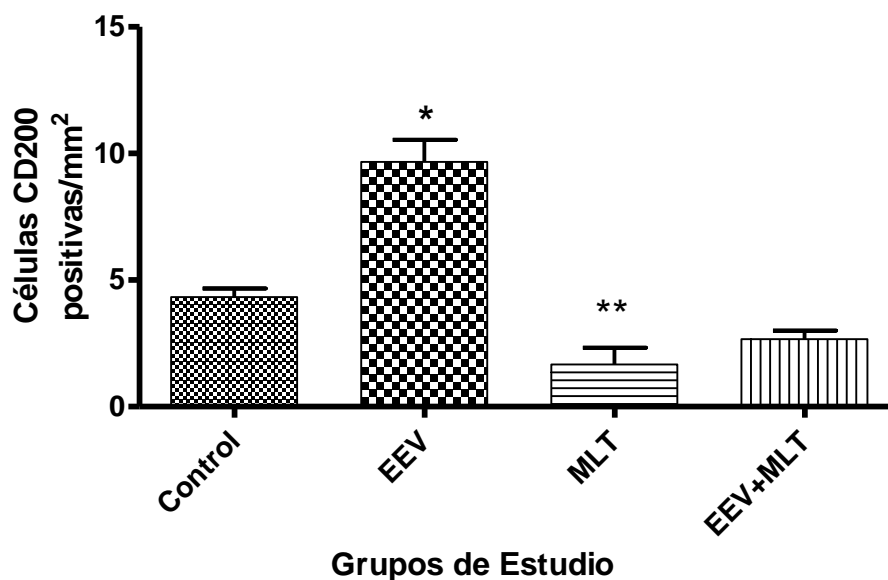


Figura 17. Activación de la microglía en el cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 µg/Kg) al 1^{er} día post-infección. * $p < 0,001$ con respecto al resto de los grupos estudiados. ** $p < 0,05$ con respecto al control.

A los 3 días post- infección se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) en el número de células activadas de la microglía en el grupo infectado con EEV ($10,330 \pm 1,528$) en relación al resto de los grupos estudiados: control ($4,667 \pm 0,577$); MLT ($1,667 \pm 1,155$); y MLT+EEV ($3,333 \pm 0,577$). Así mismo, se evidenció una disminución ($p < 0,01$) en el grupo de ratones tratados con MLT cuando se comparó con el grupo control y EEV (Figura 18).

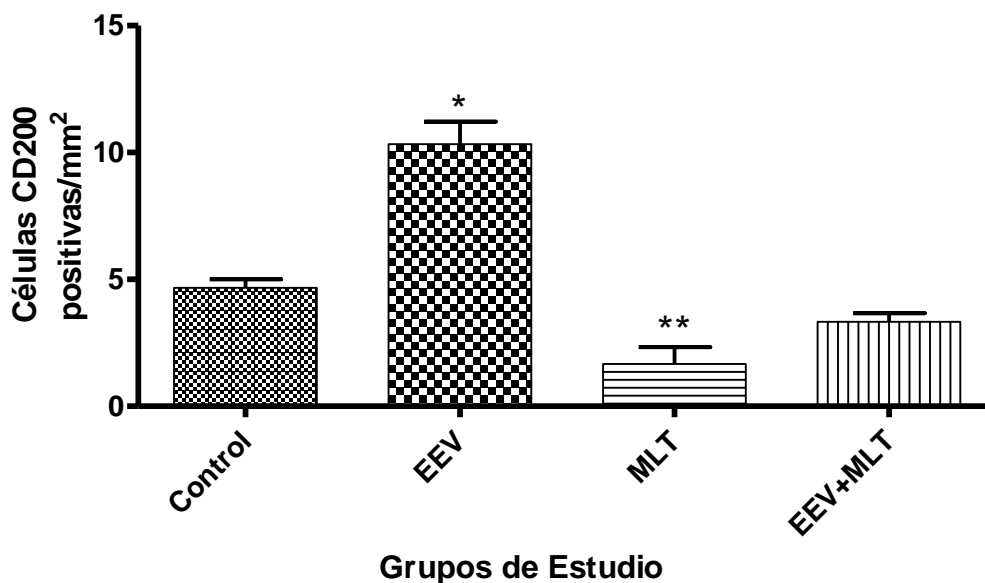


Figura 18. Activación de la microglía en el cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 µg/Kg) al 3^{er} día post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al resto de los grupos estudiados. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control y con EEV.

Un patrón similar se observó al 5^{to} día post- infección. Se obtuvieron valores elevados ($p < 0,01$) en el grupo EEV ($13,670 \pm 1,528$) cuando se comparó con el resto de los grupos: control ($6,667 \pm 1,155$); MLT ($1,6670 \pm 1,155$); y MLT+EEV ($3,667 \pm 0,577$). De igual manera se observó una disminución ($p < 0,01$) en el grupo tratado con MLT cuando se comparó con el grupo control e infectado con EEV (Figura 19).

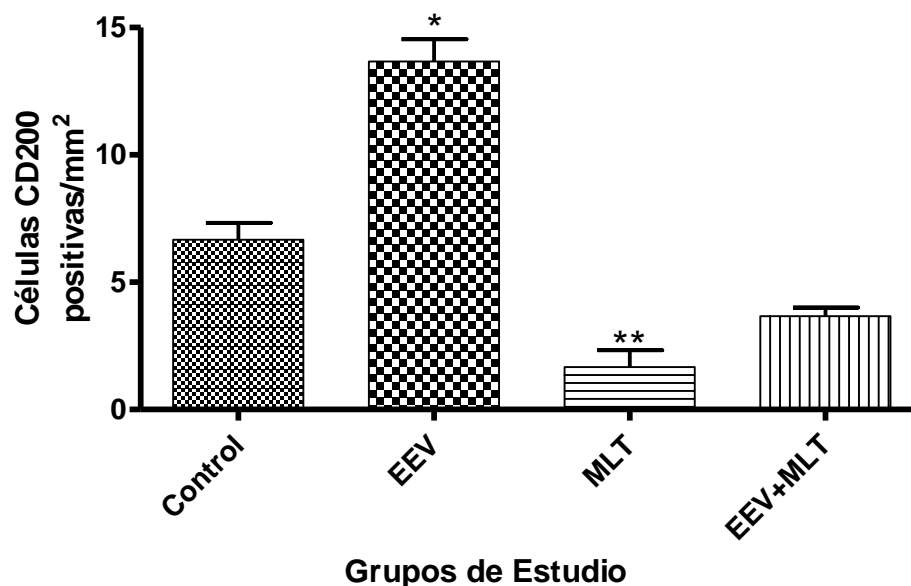


Figura 19. Activación de la microglía en el cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 µg/Kg) al 5^{to} día post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al resto de los grupos estudiados. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo control y con EEV.

En resumen se encontró que el número de células activadas de la microglía presentes en los cortes de cerebros de ratones infectados por el virus de EEV fue significativamente superior al cuantificado en los animales infectados tratados con MLT, controles sanos y en los tratados con MLT en ausencia de infección al 1^{er}, 3^{er} y 5^{to} día post- infección (Figura 20). De forma interesante, no existieron diferencias significativas entre los números de células activadas de la microglía presentes en estos tres últimos grupos de animales

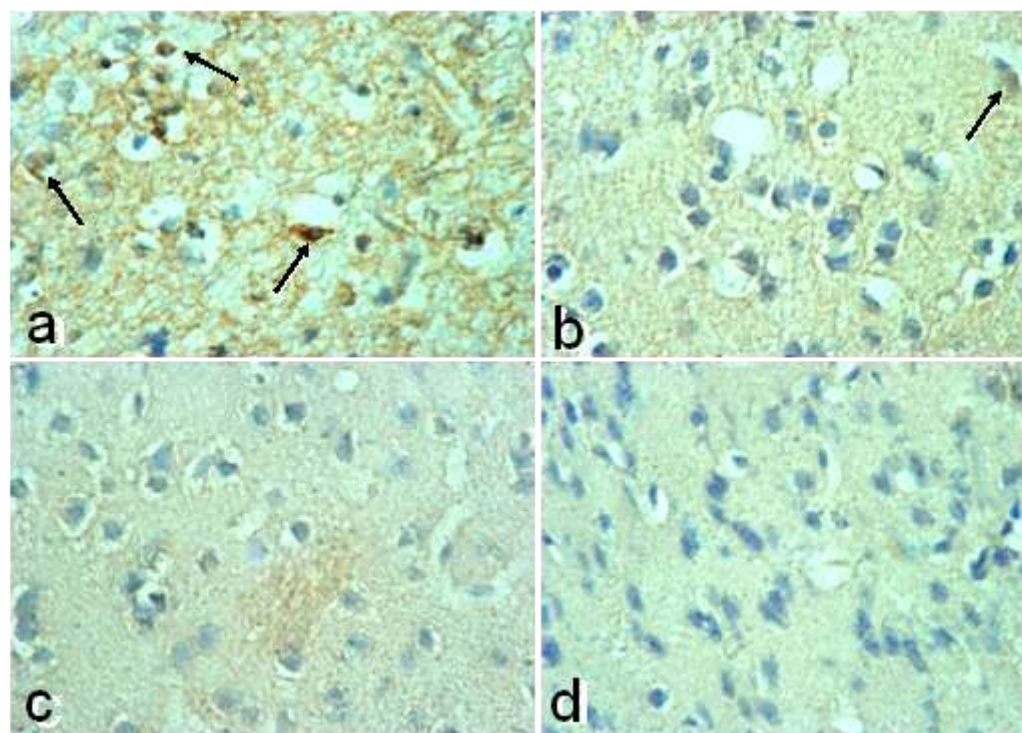
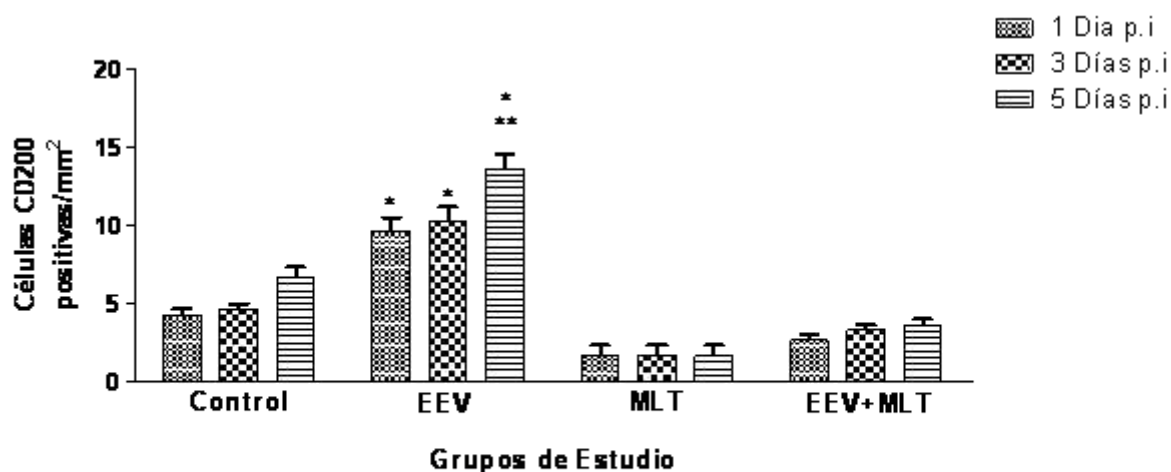


Figura 20. Activación de la microglia en el cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) a diferentes días post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al resto de los grupos estudiados en los diferentes días de post-infección. ** $p < 0,01$ con respecto al grupo de EEV al 1er día de post-infección. Las microfotografías representan la inmunohistoquímica para la activación de células de la microglia en cerebro de ratón: a) Células positivas al anticuerpo anti-CD200 en cerebro de ratones infectados por EEV al 5to día de infección (flechas). b) Cerebro de animales infectados por EEV al 5to día con tratamiento preventivo y precoz con melatonina. La flecha muestra una célula con reacción débil al anticuerpo anti-CD200. El tratamiento con melatonina (c) o con PBS (d) mostró escasa reacción al anticuerpo anti-CD200. Magnificación: 400X.

Evaluación del efecto *in vivo* de la MLT sobre la apoptosis de las células cerebrales en la infección por el virus de EEV.

A continuación investigamos el efecto del tratamiento con MLT sobre la muerte inducida por apoptosis en las células cerebrales de ratones infectados por el virus de la infección por EEV. Se infectaron los ratones con un inóculo de EEV (10 DL₅₀) se trataron o no con dosis diarias preventivas desde los tres días previos que se continuaron de forma terapéutica durante 10 días. Se emplearon como grupos controles de animales a uno formado por animales sanos que recibieron una inyección con el solvente del virus y otro también sanos que fueron tratados con MLT. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas, 3 y 5 días después de la inoculación del virus o del solvente o de la administración de MLT en su caso.

Los estudios *in vivo* revelaron que al 1^{er} día post- infección no se observaron células apoptóticas en los cerebros de ratones de los diferentes grupos ensayados. Al día 3, no hubo diferencias significativas en el número de células positivas a la reacción de TUNEL en los cerebros de ratones infectados por EEV y tratados con MLT (Figura 21).

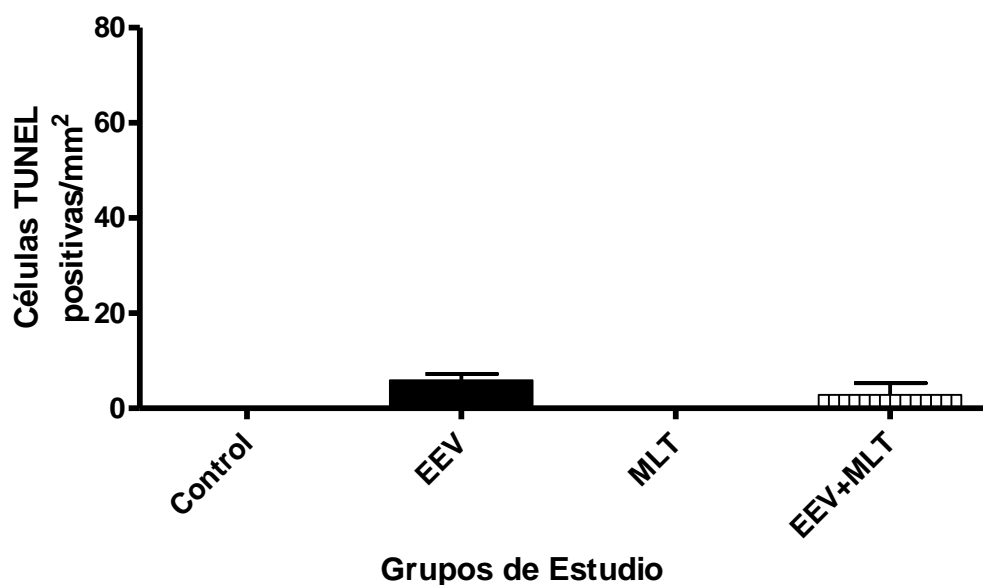


Figura 21. Frecuencia de células TUNEL positivas en cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) al 3^{er} día post-infección. Los valores del grupo control y MLT fueron cero (0).

Al 5^{to} día post- infección se obtuvieron valores elevados ($p < 0,01$) en el grupo de ratones infectados con el virus de EEV ($48,57 \pm 14,84$) cuando se comparó con el grupo de ratones infectados por EEV y tratados con MLT ($10,24 \pm 3,376$). En relación al grupo control y al grupo no infectado pero tratado con melatonina (MLT) se obtuvo un valor igual a cero (0) (Figura 22).

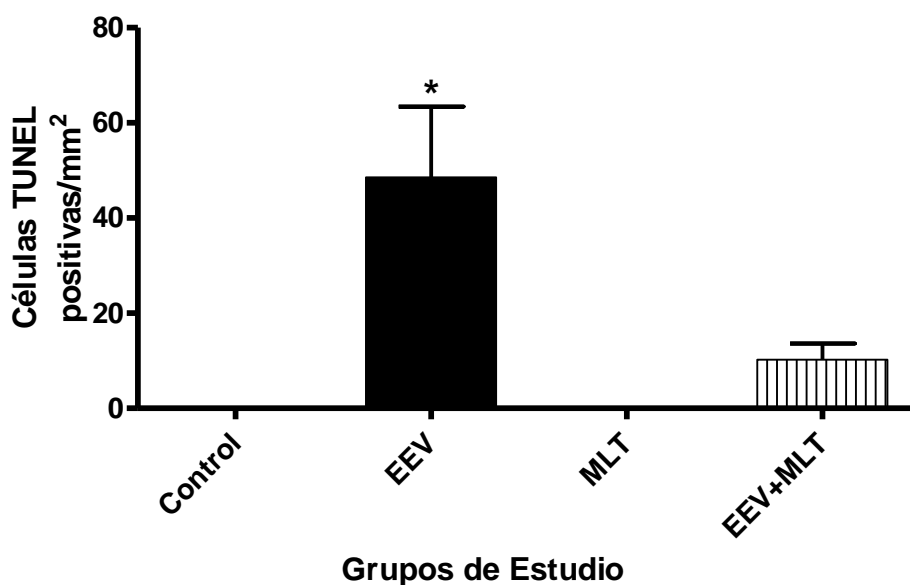


Figura 22. Frecuencia de células TUNEL positivas en cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 µg/Kg) al 5^{to} día post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al grupo de EEV+MLT. Los valores del grupo control y MLT fueron cero (0).

Por lo tanto y en resumen, los estudios demostraron que el tratamiento preventivo y precoz con MLT disminuye significativamente la apoptosis de células cerebrales inducida por la infección por EEV en ratones al quinto día de seguimiento, mostrando diferencias significativas en el número de células apoptóticas en los cerebros de ratones infectados por EEV y tratados con MLT (Figura 23).

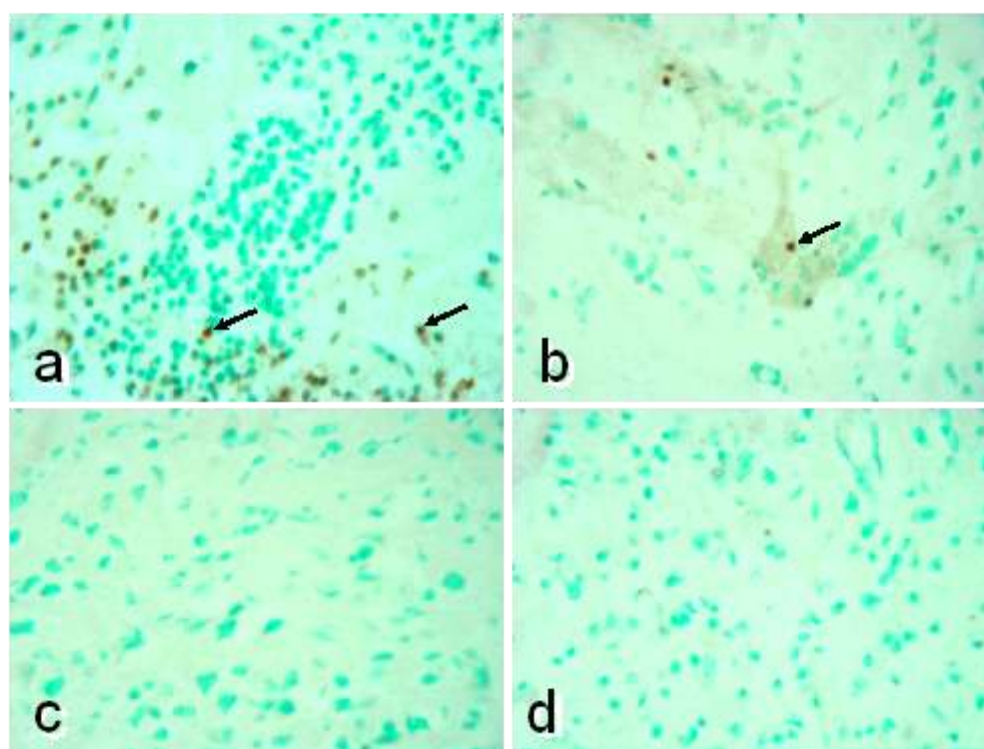
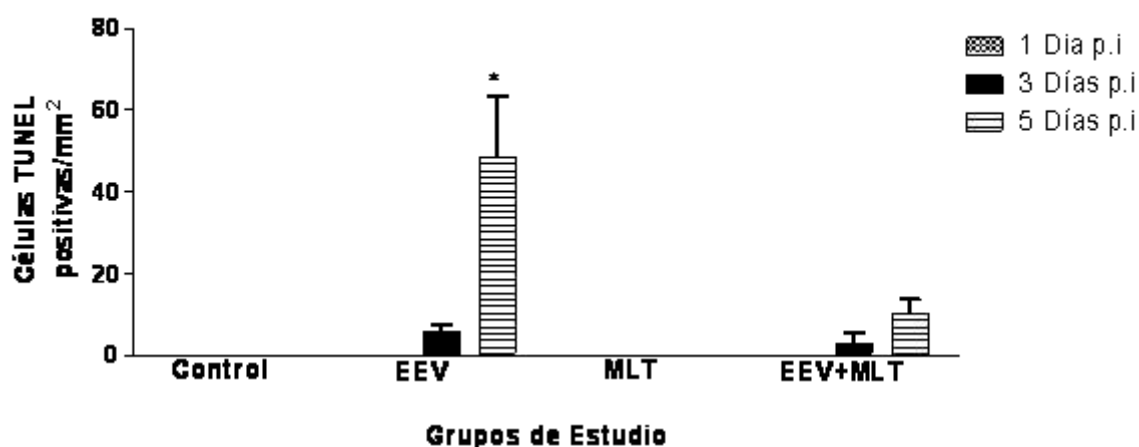


Figura 23. Frecuencia de células TUNEL positivas en cerebro de ratones infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) a diferentes días post-infección. * $p < 0,0001$ con respecto al grupo de EEV al 3^{er} día post-infección y EEV+MLT al 3^{er} y 5^{to} día post-infección. Los valores del grupo control y MLT fueron cero (0). Las microfotografías representan la apoptosis en cerebro de ratón infectado por el virus de EEV: a) Cerebro de ratón infectado por el virus de EEV al 5^{to} día de infección. Las flechas muestran células positivas a la reacción de TUNEL. b) Cerebro de ratón infectado por el virus de EEV al 5^{to} día de infección y con tratamiento preventivo y precoz con melatonina. Las flechas muestran algunas células positivas a la reacción de TUNEL. c) Cerebro de ratón tratado con melatonina. d) Cerebro de ratón tratado con PBS. Magnificación: 400X.

Determinación del efecto de la MLT sobre la generación de Nitritos en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido.

Con la finalidad de establecer la concentración óptima de MLT para los estudios *in vitro* en la infección por EEV, se cultivaron células de neuroblastoma múrido en presencia o ausencia de 1×10^{-6} UFP/ml de partículas virales en el medio durante 6, 12, 24 y 48 horas con distintas concentraciones de MLT y se cuantificó la generación de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos celulares. A las 6 horas p.i., no se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de nitritos en los sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido infectadas con EEV y tratados con diferentes dosis de MLT.

A las 12 horas p.i., se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la producción de nitritos en los grupos infectados con EEV y tratados con MLT a dosis de 0,1mM ($25,32 \pm 1,98 \mu\text{M}$); 0,5mM ($22,23 \pm 3,2 \mu\text{M}$) y 1,0 mM ($26,16 \pm 1,8 \mu\text{M}$) (Figura 24).

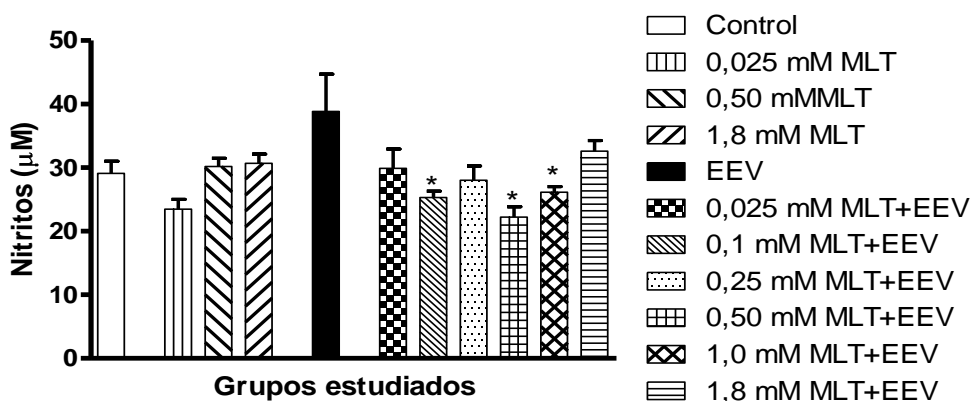


Figura 24.-Concentraciones de Nitritos en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 12 horas post-infección. * $p < 0,05$ con respecto a EEV.

A las 24 y 48 horas p.i., no se observaron cambios importantes en las concentraciones de nitritos en las células de neuroblastoma tratadas con MLT, así como tampoco en el grupo infectado por EEV, ni en los grupos infectados y tratados con MLT en relación con sus controles.

Determinación de las concentraciones de Malondialdehído (MDA) en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido infectados por el virus de EEV, tratados o no con MLT.

Al determinar la concentración de MDA en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido infectados y no infectados con EEV a las 6 horas pi., los tratados con diferentes dosis de MLT mostraron concentraciones de MDA (0,025mM= $0,98 \pm 0,50$ nM; 0,5mM= $1,32 \pm 0,39$ nM; 1,8mM= $1,59 \pm 0,44$ nM) semejantes a los controles ($1,07 \pm 1,14$ nM); pero menores ($p < 0,01$) que las observadas en los infectados no tratados (EEV= $15,09 \pm 2,71$ nM) y los infectados tratados con MLT (0,025mM= $4,64 \pm 0,52$; 0,1mM= $16,50 \pm 2,40$; 0,25mM= $16,50 \pm 0,94$; 0,5mM:= $16,52 \pm 0,45$; 1,0mM= $16,94 \pm 2,08$; 1,8mM= $15,61 \pm 1,75$ nM). Una disminución significativa ($p < 0,01$) se detectó en la producción de MDA en el grupo infectado y tratado con 0,025mM de MLT ($p < 0,01$; $4,64 \pm 0,52$ nM) al compararlo con el grupo de EEV y el resto de las dosis de MLT ensayada en los cultivos infectados.

A las 12 horas p.i., se observó que se mantiene el mismo patrón de las seis horas, pero en los sobrenadantes de cultivos infectados no tratados (EEV= $30,33 \pm 5,03$ nM) se detectó un incremento importante ($p < 0,001$) en las concentraciones de MDA con respecto a los sobrenadantes de los grupos restantes: Control ($3,24 \pm 0,72$ nM); MLT (0,025mM= $0,87 \pm 0,20$ nM; 0,50mM= $1,96 \pm 0,86$ nM 1,8mM= $2,64 \pm 0,64$ nM); MLT+EEV (0,025mM= $14,56 \pm 3,52$; 0,1mM= $13,02 \pm 2,8$; 0,25mM= $13,56 \pm 2,8$; 0,5mM= $16,04 \pm 0,61$; 1,0mM= $13,91 \pm 2,08$; 1,8mM= $14,90 \pm 3,12$ nM) (Figura 25).

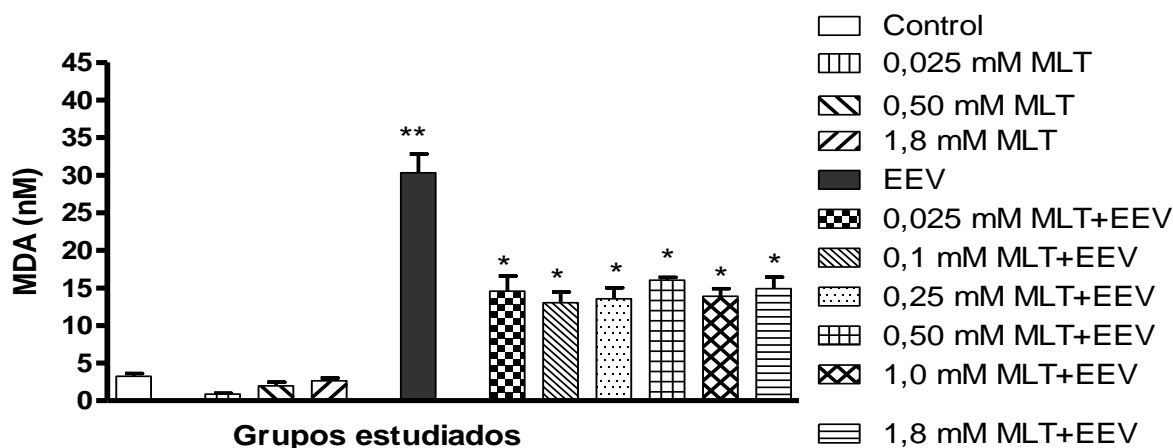


Figura 25.-Concentraciones de Malondialdehído en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 12 horas post-infección. *p<0,001 con respecto al Control, MLT y EEV, **p<0,001 con respecto a los grupos restantes

A las 24 y 48 horas p.i. se observa un patrón similar en cuanto a las concentraciones de MDA en los diferentes grupos estudiados.

Posterior a los ensayos de NO y MDA se utilizaron las concentraciones de 0,1mM; 0,5mM y 1,0mM de MLT para todos los ensayos *in vitro* con células Na₂ (Valero et al., 2006).

Evaluación del efecto *in vitro* de la MLT sobre la apoptosis de células de neuroblastoma inducidas por la infección del virus de EEV utilizando diferentes esquemas de tratamiento.

Para estudiar el efecto de MLT sobre la apoptosis inducida por el virus de EEV en células de neuroblastoma, se siguió un esquema de modulación similar a las estrategias terapéuticas establecidas en los animales de experimentación. En la modalidad denominada esquema de **tratamiento preventivo y precoz de MLT** se añadieron diferentes concentraciones finales de esta hormona (0,1mM; 0,5mM y 1,0mM) al medio de cultivo y a las dos horas se adicionó el inóculo de 1×10^{-6} UFP/ml de partículas virales al medio y se estudió el porcentaje de células apoptóticas a las 2, 4 y 6 horas. A las 2 horas después de la adición del virus al medio de cultivo, no

se obtuvieron diferencias significativas en el número de células apoptóticas en los cultivos de células de neuroblastoma en presencia o ausencia de MLT y con respecto a las células control no expuestas al virus y no infectados tratados con MLT.

A las 4 horas tras la exposición viral, se observó un incremento de la apoptosis ($p < 0,01$) en el grupo de células infectadas por el virus de EEV (32 ± 4 porcentaje de células TUNEL positivas) con respecto a los grupos de células tratadas con MLT e infectadas (MLT 0,1mM + EEV = $18,67 \pm 2,309$; MLT 0,5mM + EEV = $18,33 \pm 4,041$; MLT 1,0mM + EEV = $15,33 \pm 4,163$) y en relación a los grupos no infectados tratados con MLT (0,1mM = 2 ± 0 ; 0,5mM = $9,333 \pm 2,309$; 1,0mM = $10 \pm 3,464$). Los porcentajes de células apoptóticas en los cultivos de células de neuroblastoma tratados con MLT e infectado con el virus EEV fueron significativamente superiores a los encontrados en las células no infectadas en presencia de esta hormona.

A las 6 horas p.i., se obtuvieron valores elevados de apoptosis ($p < 0,01$) en el grupo de células infectadas por el virus de EEV ($55,33 \pm 5,033$ porcentaje de células TUNEL positivas) cuando se compararon con el resto de los grupos en estudio: células infectadas y tratadas (EEV+MLT) con todas las dosis ensayadas de MLT (0,1mM = $28 \pm 5,292$; 0,5mM = $33,33 \pm 3,055$; 1,0mM = $39,67 \pm 2,082$) con respecto al control ($0,333 \pm 0,577$) y los grupos no infectados tratados con MLT (0,1mM = $4,667 \pm 1,155$; 0,5mM = $7,333 \pm 5,033$; 1,0mM = $11,33 \pm 1,155$) (Figura 26).

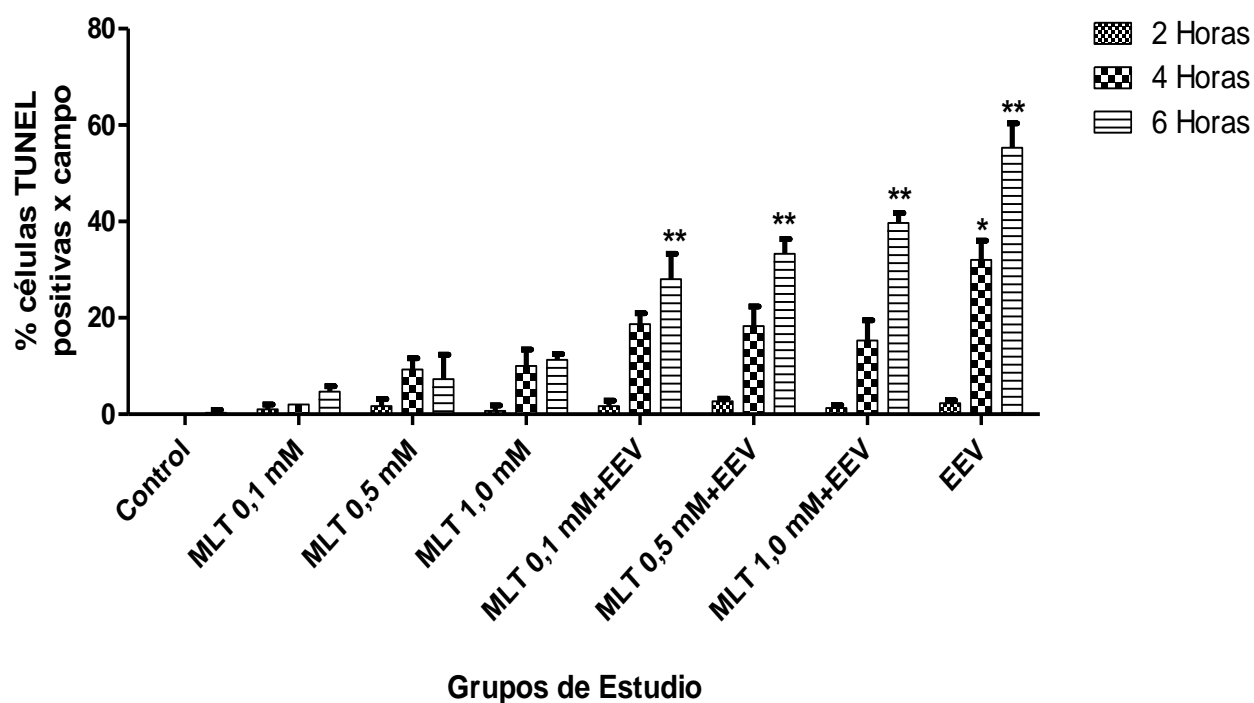


Figura 26. Número de células TUNEL positivas en cultivo de células de neuroblastoma mûrido con tratamiento preventivo y precoz con melatonina a diferentes dosis e infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana a diferentes horas post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al grupo de MLT+EEV en todas las concentraciones ensayadas, control y no infectados tratados (MLT). ** $p < 0,01$ con respecto al resto de los grupos estudiados.

También se estudio el efecto de MLT sobre la apoptosis inducida por el virus EEV en células de neuroblastoma siguiendo un esquema que simula el tratamiento precoz *in vivo*. Se anadi la MLT al medio de cultivo inmediatamente después de la adición del virus. Los resultados de los estudios *in vitro*, que siguieron el esquema de **tratamiento precoz de MLT** mostraron un patrón similar al esquema de tratamiento preventivo y precoz. A las 2 horas p.i., no se obtuvieron diferencias significativas en el número de células apoptóticas en cultivos de células de neuroblastoma infectadas por EEV y tratadas con diferentes dosis de MLT al compararlo con los grupos no infectados tratados con MLT.

Se observó un patrón similar ($p < 0,01$) a las 4 horas p.i. en el grupo de células infectadas por el virus de EEV (16,33±2,517 porcentaje de células TUNEL positivas) con respecto a los grupos de células tratadas e infectadas (MLT 0,1mM + EEV= 9,33±1,155; MLT 0,5mM + EEV= 9,667±2,87; MLT 1,0mM + EEV=7,667±2,08) y en relación a los grupos no infectados tratados con MLT (0,1mM= 1±0; 0,5mM= 4,667±1,155; 1,0mM= 5±1,732). De igual manera se observó una disminución significativa ($p < 0,01$) en el grupo de células infectadas y tratadas con MLT a diferentes dosis cuando se comparó con el grupo de células infectadas por el virus de EEV.

Mientras que a las 6 horas p.i., se obtuvieron valores elevados ($p < 0,01$) en el grupo de células infectadas por el virus de EEV (27,67±2,517 porcentaje de células TUNEL positivas) cuando se compararon con el resto de los grupos en estudio: células infectadas y tratadas (EEV+MLT) con todas las dosis ensayadas de MLT (0,1mM= 14±2,646; 0,5mM=16,67±1,528; 1,0mM=19,67±1,155) con respecto al control (0,333±0,577) y los grupos no infectados tratados con MLT (0,1mM= 2,333± 0,577; 0,5mM= 3,667±2,517; 1,0mM= 5,667±0,577); igualmente se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en las células infectadas y tratadas (EEV+MLT) con todas las dosis ensayadas de MLT con respecto al control de células infectadas por EEV (Figura 27).

Los resultados obtenidos con la aplicación del esquema de **tratamiento tardío de MLT** a diferentes dosis (0,1mM; 0,5mM y 1,0mM) y a diferentes horas post-infección no arrojaron diferencias significativas en el número de células apoptóticas en los cultivos de células de neuroblastoma múrido infectados por EEV (Datos no tabulados) .

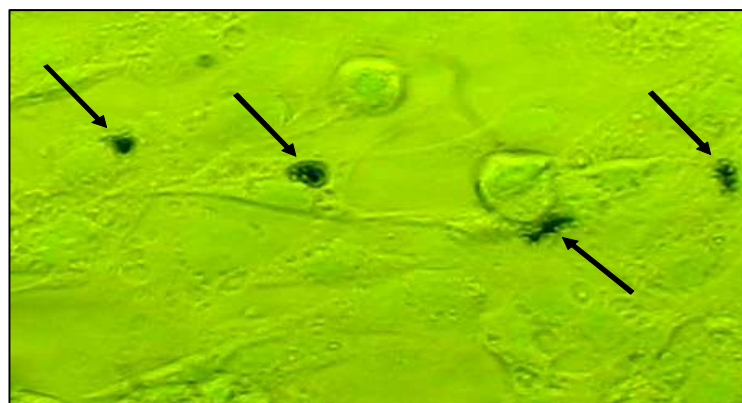
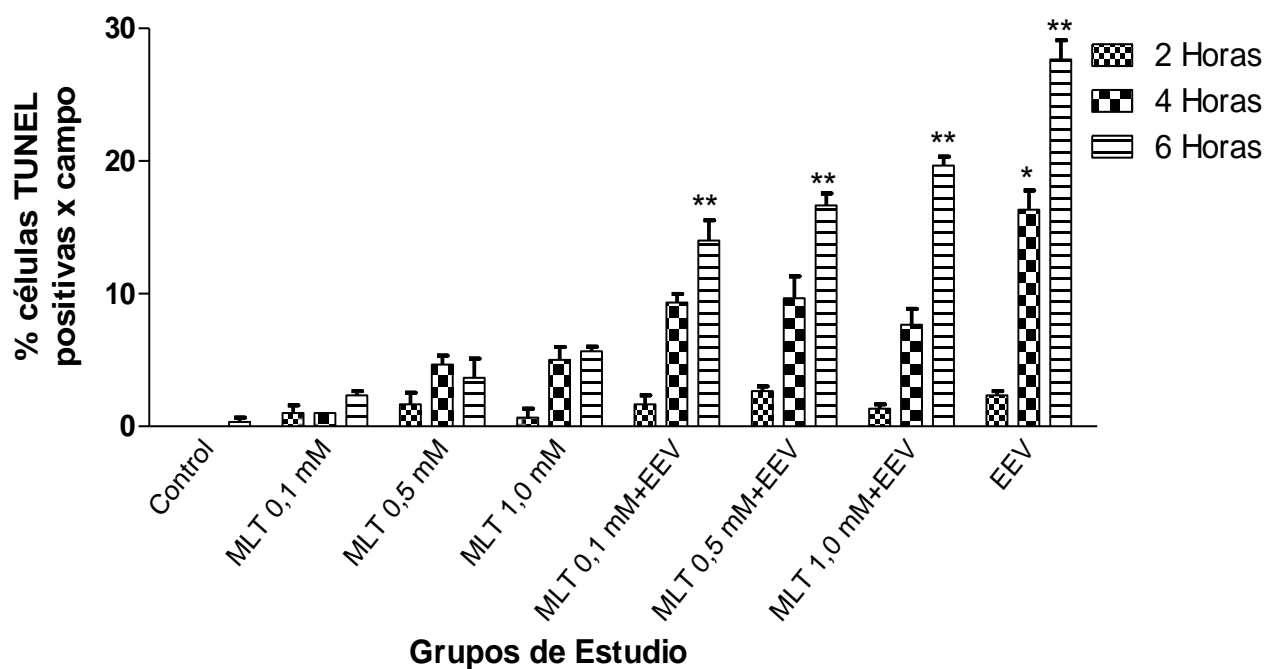


Figura 27. Número de células TUNEL positivas en cultivo de células de neuroblastoma múrido con tratamiento precoz con melatonina a diferentes dosis e infectados por el virus de Encefalitis Equina Venezolana a diferentes horas post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al grupo de MLT+EEV en todas las concentraciones ensayadas, control y no infectados tratados (MLT). ** $p < 0,01$ con respecto al resto de los grupos estudiados. La microfotografía representa el cultivo de células de neuroblastoma múrido (Na_2) infectado por el virus de EEV por 6 horas. Las flechas muestran células reactivas al TUNEL. Magnificación original 400X.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se demuestra que la MLT posee un efecto terapéutico sobre la infección por EEV en ratones. De los diferentes regímenes terapéuticos analizados, el empleo preventivo, mantenido y el tratamiento precoz con MLT tras la infección, son los que ejercen el mayor efecto protector en los ratones. Por lo tanto, la administración de MLT constituye una opción terapéutica para esta dramática enfermedad infecciosa y nuestros hallazgos contribuyen a establecer un racional para su potencial desarrollo clínico. En el desarrollo de esta discusión vamos a seguir un orden similar al establecido en el apartado de resultados.

Maestroni et al., (1988), fueron los primeros en reportar que la administración de MLT a ratones tras ser sometidos a un estrés agudo y a la inoculación del virus de la encéfalomiocarditis previene la parálisis y la muerte en ratones. **Ben-Nathan et al., (1995)**, evaluaron la actividad antiviral de la MLT ante la infección producida por un arbovirus clásico productor de encefalitis en el ratón, el virus Semliki Forrest (SFV). Éste es considerado de baja patogenicidad en humanos, pero su replicación en el cerebro del ratón conduce a la muerte. Sin embargo, la inyección de MLT (500µg/Kg.) diaria de forma preventiva y mantenida redujo la mortalidad en los ratones inoculados con 10 UFP de SFV, de 100% a 60%. En los ratones infectados con una dosis mayor de virus (100 UFP), la mortalidad fue reducida sólo en un 20%.

Bonilla et al., (1997), demostraron que la administración de MLT desde antes de la infección por el virus EEV protege a los ratones de su muerte. Otros reportes sugieren que la MLT también prolonga el tiempo de sobrevivencia de ratones inmunodeprimidos e infectados por el virus de EEV (**Bonilla et al., 2001**). Esta protección es aproximadamente el 50% de la observada en ratones inmunocompetentes, hallazgo que sugiere que esta indolamina requiere por lo menos parcialmente, de la integridad del sistema inmunitario para ejercer su actividad protectora.

En el presente trabajo, hemos investigado de forma comparativa diferentes modalidades de administración terapéutica de MLT a ratones infectados con el virus

de EEV. En primer lugar, hemos mantenidos el esquema de administración preventiva y precoz de MLT desarrollado por nuestro grupo previamente (Bonilla et al., 1997; 2001). Además y para ajustarnos a la previsible realidad clínica, estudiamos un esquema de administración terapéutica precoz de MLT que se aplica al ratón inmediatamente después del inóculo y otro tardío en la que se difiere 24 horas. Desafortunadamente la administración de MLT a las 24 horas de la infección carece de efecto benéfico sobre la supervivencia del animal en este modelo de enfermedad letal. Estas condiciones experimentales de muerte de 100% de los animales son claramente de mayor patogenicidad que las observadas en el entorno epidemiológico venezolano y del resto del continente Americano. Por lo tanto, y ateniéndonos a los resultados obtenidos en otras formas de administración experimental, no es pertinente concluir la ausencia de valor terapéutico de la administración de MLT ante la infección natural del virus y en condiciones experimentales sub letales.

La administración terapéutica precoz de MLT tras la infección de EEV en los ratones muestra un efecto beneficioso con significativa reducción de la mortalidad al 7^{mo} día de seguimiento. La modalidad de administración preventiva y precoz consigue también reducción de la mortalidad al 7^{mo} día de seguimiento. De forma interesante ambas modalidades de tratamiento con MLT en este modelo de infección letal consigue mantener un porcentaje significativo de supervivencia de 25% de los animales a los 10 días de seguimiento. De estos resultados puede inferirse que tanto la administración preventiva y mantenida de forma precoz como la iniciada tras la infección por dosis letales del EEV consiguen efectos beneficiosos que en términos terapéuticos a largo plazo son similares. Desde una perspectiva de potencial práctico nuestros hallazgos confieren el racional para realizar un ensayo clínico con tratamiento de MLT en personas que van a exponerse a un entorno epidemiológico de riesgo o en aquellos sujetos donde existe evidencia de haber recibido un inóculo del virus.

Este efecto beneficioso de la MLT sobre la supervivencia a la infección por EEV en animales experimentales, puede explicarse por diferentes mecanismos de acción

de la hormona. Estos incluyen los moduladores de la respuesta inmunitaria/inflamatoria a la infección, así como la de la inducida en las células infectadas, además de la posible acción directa sobre el virus. La protección provista por la MLT contra el daño oxidativo a componentes celulares (Reiter, 1995) pudiera ser responsable, en parte, del incremento en la tasa de supervivencia de los ratones infectados inmunodeprimidos. A este respecto, se ha demostrado que en ratones con deleciones en los genes tanto del receptor para IFN $\alpha\beta$ (IFNAR-1^{-/-}) como del factor 2 regulador del IFN (IRF-2^{-/-}) fueron más susceptibles a la infección por el virus de EEV que los ratones no genéticamente modificados. Los ratones IFNAR-1^{-/-} exhibieron diseminación acelerada del virus de EEV en el suero y cerebro cuando se compararon con los controles.

Además, la infección incrementó los niveles de NO en esos cultivos, pero disminuyó en los estimulados con IFN γ . Estos hallazgos sugieren que las especies reactivas de nitrógeno (RNS), juegan un papel importante en la extensión del virus de EEV (Schoneboom et al., 2000). Es interesante destacar que la MLT inhibe la actividad de la NOS cerebral (Pozo, 1997) y es un potente reductor del NO *in vitro* (Noda, 1999). En cultivo de macrófagos murinos, la MLT inhibe la producción de NO debido a una reducción de los niveles del ARNm de iNOS y su expresión proteica (Gilad, 1998). En esplenocitos de ratones infectados con el virus de EEV se observó producción incrementada de NO, las cuales fueron disminuidas por el tratamiento con MLT, otro hallazgo que sugiere que la MLT ejerce su efecto protector utilizando un mecanismo que involucra un descenso del NO en el tejido blanco de ratones infectados con EEV (Valero et al., 2005).

Por otro lado y recientemente, se ha prestado mucha atención a la activación de la microglía como factor importante en la patogénesis de las infecciones encefálicas virales. Se ha demostrado que la MLT posee un efecto protector en modelos experimentales de infección por el virus de la EEV y se ha observado tanto en sistemas experimentales *in vivo* como *in vitro*. Entre los efectos inducidos por la administración de MLT se han planteado sus acciones sobre la generación de

moléculas proinflamatorias y mediadores lesivos celulares como las especies de oxígeno reactivo (ROS) puedan implicarse en su capacidad preventiva y terapéutica de esta infección. Así, su función como un antioxidante en el cerebro pudiera ponerse de manifiesto en las células que los generan de forma preferente en el entorno de estas infecciones virales que son las microglías (Zhou et al., 2008).

La microglía en condiciones normales o de salud se encuentra en su forma inactiva y es considerada como una población importante en el mantenimiento del entorno fisiológico del SNC. La activación de estas células se ha observado en forma preferente en el contexto de daños inflamatorios o degenerativos del tejido encefálico (Ming-Yang et al., 2007).

En esta investigación observamos que la administración de MLT en animales sanos no induce cambios en el estado de activación de la microglia, sin embargo disminuye de forma intensa la inducida por la infección por el EEV. El tratamiento preventivo y precoz con MLT disminuyó dramáticamente la activación microglial identificada por la expresión del antígeno CD200 en los cerebros de ratones infectados.

Existen evidencias de que las neuronas controlan el estado de activación de la microglía, contribuyendo a su estado quiescente. Uno de los mecanismos sugeridos de cómo las neuronas ejercen esta función es a través de la interacción con el ligando CD200, una glicoproteína de membrana presente en las neuronas, con su receptor CD200R que es expresado abundantemente en las células mieloides, entre ellas la microglía (Neuman, 2001; Wright et al., 2003).

Se ha propuesto que la señalización producida por la interacción CD200-CD200R disminuye la actividad de las células mieloides con inducción de diferentes efectos inmunorreguladores (Jenmalm et al., 2006). **Gorczynski** observó que la interacción de CD200 con CD200R produce un efecto inmunoregulador que determina una disminución de la producción de citocinas Th1. Además, la

interacción de CD200 con su receptor provoca una señal inmunosupresora que lleva a la inhibición de los macrófagos, a la inducción de células T reguladoras, a cambio del perfil de citocinas desde Th1 a Th2 e inhibición de la inmunidad específica de tumor de las células T (**Moreaux et al., 2008**). Estos hallazgos apoyan la idea de que las interacciones CD200-CD200R son importantes en la inmunoregulación (**Gorczynski, 2001**). También se ha indicado que la interacción entre CD200 y su receptor juega un papel importante en la modulación de la activación de la microglía en condiciones inflamatorias crónica y aguda del cerebro. Además se ha visto que la IL-4 modula la expresión del CD200, identificando un mecanismo de regulación directa en la activación de la microglía. (**Lyons et al., 2007**). La relevancia funcional de la expresión de CD200 por la microglia se extiende a otros procesos neurodegenerativos como el Parkinson (**Wang et al., 2007**).

Por otro lado, **Ming-Yang et al., (2007)**, demostraron que la MLT inhibe la respuesta inflamatoria celular cerebral inducida por la isquemia cerebral por distintos mecanismos que incluyen: la reducción de la migración de los neutrófilos circulantes y macrófagos/monocitos dentro del cerebro isquémico y mediante la disminución de la activación microglial.

Un posible mecanismo para la neuroprotección mediada por la MLT implica sus acciones antioxidantes y anti-inflamatorias. **Seung-Yun et al., (2003)**, sugieren que la MLT atenúa la muerte neuronal inducida por el ácido kainico (KA), la peroxidación lipídica y la activación microglial. Sugiriendo que la MLT es potencialmente útil en el tratamiento de patologías agudas cerebrales asociadas con daño neuronal inducidos por el estrés oxidativo como lo son la epilepsia, infartos, lesiones traumáticas cerebrales, entre otras.

Olivier et al., (2009), investigaron el efecto de la MLT en ratas que presentaban daño en la materia blanca del cerebro y demostraron que la administración de MLT estuvo asociada con la disminución de la activación microglial y la reacción astrogliar. La MLT previno los defectos de mielinización de la materia blanca. Por consiguiente,

podría ser considerada como un candidato neuroprotector efectivo no sólo en daños cerebrales sino también en enfermedades inflamatorias y desmielinizantes observadas en adultos.

Otros investigadores indican el efecto protector de la MLT en daños neuronales en el hipocampo de ratas adultas inducidos por el ácido domoico (DA), un potente inductor de neurotoxicidad, para demostrar degeneración neuronal seguida por la activación glial con la participación del iNOS en el hipocampo. Demostraron que la muerte neuronal inducida por DA, la activación glial y la expresión de la proteína iNOS fueron atenuadas significativamente por la MLT. Estos resultados demuestran que la MLT tiene efectos potenciales para el tratamiento de patologías asociadas con daños cerebrales y se especula que la astrogliosis y la inducción de la expresión de proteínas iNOS en las neuronas y los astrocitos del hipocampo pudieran ser en respuesta a la degeneración neuronal inducida por DA (**Ananth et al., 2003**).

Finalmente es conocido que la MLT es una indolamina que está implicada en muchas funciones fisiológicas importantes. Sin embargo, en los últimos años, el interés ha aumentado a causa de su influencia en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. El mecanismo exacto por el cual la MLT influye en la apoptosis aún no está claro, dado que la MLT tiene acciones tanto a favor como anti-apoptóticas (**Espino J. et al., 2010**).

En el presente estudio se pudo demostrar el efecto anti-apoptótico de la MLT, en la infección por el virus de EEV, al observar al 5^{to} día post infección en los cerebros de ratones infectados por el virus, un aumento en el número de células apoptóticas y disminución en los cerebros de los animales infectados cuando fueron tratados con 500µg/ Kg de MLT. Este efecto estuvo relacionado al tiempo de tratamiento, sugiriendo que las neuronas podrían ser afectadas por la infección. Estos hallazgos fueron muy similares a los encontrados *in vitro* en cultivos de células de neuroblastoma múrido, en los cuales se observó a las 4 y 6 horas, un aumento en

las células positivas a la reacción de TUNEL en los cultivos infectados y disminución cuando las células infectadas fueron tratadas con MLT a diferentes dosis y tiempos de ensayos. Este efecto no fue dosis dependiente, pero si relacionado al tiempo de tratamiento, demostrando que en la infección por el virus de EEV, la MLT tiene efecto anti- apoptótico. Debido a que la línea celular es proveniente de neuronas, es posible que una de las células implicadas en la apoptosis *in vivo* sean las neuronas.

La MLT por ser una hormona lipofílica puede cruzar rápidamente la barrera hematoencefálica (BHE) y entrar en el interior de la célula en donde puede acumularse. Se ha demostrado que la MLT puede ser un potente capturador de radicales libres y antioxidante que protege a las células contra el daño inducido por diversas condiciones patológicas en las que se incluye el SNC (**Skrzdlewska, 2001**; **Wolfler, 2001**; **Allegra et al., 2003**). Por otra parte, la MLT también es un capturador de peroxinitrito e inhibe la producción de NO. También inhibe la ocurrencia del rompimiento de las cadenas simples del ADN, en respuesta al peroxinitrito y reduce la supresión de la respiración mitocondrial en macrófagos cultivados. Estas acciones pueden contribuir a los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de la MLT en distintas condiciones fisiopatológicas. El efecto neuroprotector de la MLT, demostrado en estudios anteriores en el modelo murino de EEV, puede reflejar su papel como capturador de radicales libres, antioxidantes y anti-apoptóticos (**S. Y. Chung et al., 2003**; **Pedrañez A., et al, 2004**).

La capacidad antioxidante de la MLT ha sido usada en humanos y en diferentes modelos experimentales para disminuir el estrés oxidativo (**Malhotra et al., 2004**; **Reiter, 2004**; **Claustract et al., 2005**). Previos estudios han demostrado el efecto beneficioso de esta hormona en el modelo murino de la infección por el virus de la EEV (**Bonilla et al., 1997**; **Valero, 1998**; **Medina-Leendertz et al., 1999**; **Bonilla et al., 2001**; **Medina-Leendertz et al., 2001**; **Negrette et al., 2001**; **Valero et al., 2002**; **Arias et al., 2003**; **Bonilla et al., 2003**; **Bonilla et al., 2004**). La disminución de la producción de NO por el tratamiento con MLT podría estar relacionada a la capacidad que tiene esta hormona de inhibir la expresión de la iNOS y por su capacidad de “secuestrar” el NO (**Bonilla et**

al., 2004; Chang et al., 2005; Kilic et al., 2005). Similares resultados, se han descrito en un modelo de abrasión del cuello uterino en ratones, donde el tratamiento con MLT disminuyó los niveles tisulares de NO y la peroxidación lipídica (Ara et al., 2005).

Estos hallazgos fueron muy similares a los encontrados *in vivo* y sugieren que una de las células probablemente afectadas por la infección, fueron las neuronas, dado que estudios previos han demostrado la alteración de células de la microglia, astrocitos y neuronas por el virus de la EEV, arrojando como resultado un aumento de la producción de NO (Schoneboom et al., 2000). Basado en nuestros resultados se propone que el efecto anti- apoptótico de la MLT no es debido en parte al daño oxidativo y ha sido observado tanto *in vivo* como *in vitro* en la infección por el virus de EEV pudiendo ser considerada como una característica importante de la patogénesis viral.

En relación a estos hallazgos Kleinschmidt et al., (2007), indicaron que el virus West Nile o del Nilo Occidental (WNV) que se caracteriza por causar meningitis y encefalitis severas en seres humanos, es capaz de inducir apoptosis. Igualmente revelaron que la apoptosis se ha observado recientemente para contribuir a la patogénesis viral, al demostrar en células tumorales de la línea T98G derivadas de cerebro, las cuales son muy permisivas a la infección por el WNV, una disminución en la viabilidad celular e inducción de la apoptosis por la activación de la caspasa efectora 3, las caspasas iniciadoras 8 y 9, poli (ADP- ribosa) polimerasa (PARP) y la liberación del citocromo c desde las mitocondrias. La inhibición de la caspasa 8 o 9 inhiben la división de PARP, demostrando que ambas caspasas están involucradas en la apoptosis inducida por el WNV. Sugiriendo que tanto la vía intrínseca como extrínseca de muerte están involucradas para explicar el mecanismo molecular del virus.

Por otro lado, **Diniz et al., (2006)**, investigaron en cultivos primarios de neuronas y astrocitos de ratones recién nacidos inoculados con el virus WNV (cepa NY385-99) para entender su patogénesis viral, dos resultados diferentes. La infección por el WNV en las neuronas fue rápidamente progresiva y destructiva; todas las neuronas fueron destruidas por apoptosis y en los astrocitos la infección evolucionó más lentamente y no parece ser muy letal para la célula, indicando que los astrocitos pueden desarrollar una infección viral crónica o persistente, sugiriendo que esta célula podría jugar un papel importante en el mantenimiento del virus en el SNC.

Weissenbock et al., (2000), indicaron que en ratas lewis neonatalmente infectadas por el virus de la enfermedad de Borna, se caracterizan por presentar un comportamiento de hiperactividad, desórdenes y alteraciones en la interacción social. El virus se distribuye ampliamente en el cerebro; y su neuropatología se enfoca en el cerebelo y la neurocorteza donde las células de purkinje y las células piramidales se pierden por apoptosis. A pesar de que una respuesta inmunitaria transitoria está presente, su distribución no se correlaciona con los sitios de daño. La neuropatología es en cambio localizada junto con la proliferación microglial y expresión de las moléculas clase I y II del MHC, ICAM, CD4 y CD8. Indicando que la patogénesis en este sistema parece estar vinculada a la activación de la microglía y a la susceptibilidad de poblaciones neuronales específicas a la apoptosis en lugar del tropismo viral o la respuesta inmunitaria específica para el virus.

Ciertos autores han reportado que la MLT es capaz de reducir la apoptosis por la señalización del calcio en leucocitos humanos. El agotamiento de las reservas de calcio intracelular estimula las caspasas 3 y 9 de una forma dependiente del tiempo en leucocitos humanos. La activación de las caspasas inducida por la señal del calcio está asociada con la apertura del MPTP (Poros de transición de la permeabilidad mitocondrial), la cual está acompañada de un aumento del citocromo c mitocondrial y la activación del Bax. La MLT fue capaz de reducir la activación de las caspasas 3 y 9, que es principalmente debido a la modulación de la apertura del MPTP y la activación del Bax. Esto pone de manifiesto el posible interés de la función de la

MLT, como un controlador de la vida/muerte de las células inmunitarias dentro de los organismos (Espino J. et al., 2010).

Pedreañez et al., (2004), indicaron que en el tejido renal de ratas con nefrosis por aminonucleósidos de puromicina (PAN), la MLT tiene efecto anti-apoptótico, que en parte puede ser independiente de la modulación del estado oxidativo, dado que el efecto antioxidante del tratamiento con MLT no alcanzó una significancia estadística. La disminución de la apoptosis puede ser el resultado en parte de una vía alternativa no identificada. Por otro lado, **Kunduzova et al., (2003)**, demostraron que la MLT previno la peroxidación lipídica, la muerte de las células apoptóticas y necróticas después de la reperfusión isquémica (IR), y el bloqueo en la actividad de la caspasa-3, mejorando la función renal.

Tomando en cuenta todos los hallazgos de esta investigación se demuestra que el efecto protector de la MLT sobre la apoptosis y activación de la microglía durante la infección por el virus de la EEV, tanto *in vivo* como *in vitro*, pudiera ser debido en parte a los mecanismos antioxidantes e inmunorreguladores mediado por la producción de NO, la peroxidación lipídica y la IL-1 β en el SNC. Se requieren nuevos estudios para definir los mecanismos íntimos que permiten a la MLT modular la producción del NO cerebral durante esta infección y su relación con el sistema de citocinas cerebrales.

Durante la última epidemia de Encefalitis Equina Venezolana, fueron afectados todos los grupos etéreos. Los pacientes usualmente presentaron dolor de cabeza severo, mialgia, postración, vómito y en algunos casos diarrea (Valero et al., 1996). Las convulsiones, desorientación y la depresión mental fueron hallazgos frecuentemente observados en los pacientes. Se reportaron más de 20 muertes asociadas al virus, entre adultos y niños de Venezuela y Colombia. Por esta razón, el efecto protector de la MLT en ratones infectados con el virus de la EEV, garantiza futuras investigaciones, especialmente en lo referente a las vías de administración de la MLT, a fin de reducir la tasa de mortalidad de los ratones infectados y la

posibilidad de utilizar esta hormona para el tratamiento de humanos y équidos infectados con o susceptibles a la infección con este virus.

VI. CONCLUSIONES

De este trabajo experimental de investigación del efecto de la MLT sobre la acción patogénica del virus de EEV en un modelo experimental *in vivo* de infección murina y en un sistema celular *in vitro* se concluye que:

1. El tratamiento preventivo con MLT, previo a la inoculación de dosis letales del virus, así como el iniciado de forma precoz y ambos mantenidos ininterrumpidamente poseen efecto protector aumentando la supervivencia de los animales infectados. Sin embargo, el retraso del inicio del tratamiento con MLT a al menos un día después de la inoculación provoca su pérdida de eficacia terapéutica en este modelo experimental de la encefalitis.
2. El tratamiento preventivo y precoz ininterrumpido con MLT disminuye la activación patológica de las células de la microglia en los cerebros de ratones infectados por el virus de EEV.
3. El tratamiento preventivo y precoz ininterrumpido con MLT disminuye la apoptosis celular inducida en los cerebros de ratones infectados por el virus de EEV.
4. La MLT inhibe la apoptosis inducida por el virus de EEV en células del neuroblastoma.
5. Tomados en conjuntos estos resultados, se concluye que la MLT posee efecto terapéutico sobre la infección por el virus de EEV, aumentando la supervivencia y disminuyendo el daño cerebral de los animales afectados. Futuros trabajos establecerán su potencial relevancia clínica en la prevención y tratamiento de pacientes con esta infección.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Acarin L., Vela JM., González B., Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. **J. Histochem Cytochem.** 42:1033-1041, 1994.
2. Acha P., Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud (OPS). **Publicación Científica** N°503 Segunda Edición. 324-333, 1992.
3. Ajamin B., Bennett JL., Krieger C., Tetzlaff W., Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nat Neurosci.** 10:1538-1543, 2007.
4. Akiyama H., Bargers S., Bradt B., Bauer J., Cole GM., Cooper NR., Eikelerboon P., Emmerling M., Fiebich B., Finch CE., Frautschy S., McGreen PI., Strohmeyer R., Tooyama I., Wenk G., Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimers disease. **Neurobiol. Aging.** 21: 241-383, 2000.
5. Allegra M., Reiter RJ., Tan Dx., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **J. Pineal Res.** 34(1):1-10, 2003.
6. Ananth C., Gopalakrishnakone and Kaur C. Protective role of melatonin in Domoic Acid-Induced Neuronal damage in the hippocampus of adult rats. **Hippocampus.** 13:375-387, 2003.
7. Angeli A., Gatti G., Sartori ML., Del Ponte D., Cerignola R. Effect of exogenous Melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. **The Pineal Gland and Cancer, Muller and Bass, Tubingen.** 145-157, 1988.
8. Aovacheria A., Brunet F. and Gouy M. Phylogenomics of Life-Or-Death switches in multicellular animals: Bcl-2, Bh3-only and Bnip families of apoptotic regulators. **Mol. Biol. Evol.** 22(12): 2395-2416, 2005.
9. Appay V. T-cell based vaccines: Where are we? **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2(4):463-5, 2004.
10. Ara C., Kirimlioglu H., Karabulut AB., Coban S., Hascalik S., Celik O., Yilmaz s., Kirimlioglu V. Protective effect of melatonin against oxidative stress on adhesion formation in the rat cecum and uterine horn model. **Life Sci.** 77(12):1341-50, 2005.
11. Arango M.C., Fernández L.L., Díaz R.T., y García M.E. La apoptosis: Características y su papel en la transformación maligna de la célula. **Rev. Cubana Oncol.** 13(2): 57-8, 1997
12. Arias, J., Meleán, E., Valero, N., Pons, H., Chacín-Bonilla, L., Larreal, Y., Bonilla, E. Efecto de la Melatonina en la proliferación linfocitaria y la producción de

- Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 beta (IL-1 β) en esplenocitos de ratones. *Invest Clin*. 44(1): 41-50, 2003.
13. Aschner M., Sonnewald U., Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol*. 12(4):475-81, 2002.
 14. Atre D., Blumenthal EJ., Melatonin: immune Modulation of spleen cell in young, middle-aged and senescent mice. *Mech Ageing Dev*. 103 (3): 255-268, 1998.
 15. Avilan R. Situación actual de la Encefalitis equina Venezolana y otras arbovirosis en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*. 104 (1): 14-24, 1996.
 16. Battista D., Ferrari CC., Gage FH., Pitossi FJ. Neurogenic niche modulation by activated microglia: Transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 23:83-93, 2006.
 17. Beattie EC., Siellwagen D., Morisbha W. Control of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci*. 22: 3025-3032, 2002.
 18. Beattie MS., Farooqui A., Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 17: 915-925, 2000.
 19. Behan, WM.; McDonald, M.; Darlington, LG et al. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenil. *Br J Pharmacol*. 128: 1754-1760, 1999.
 20. Bellard M., Levine S., Bonilla E. Encefalitis equina Venezolana. Revisión. *Inves Clin* 30 (1): 31-58, 1989.
 21. Blamire A., Anthony D., Rajagopalan B., Sibson N., Perry V., Styles P. Interleukin 1 β -induced changes in blood brain barrier permeability, apparent diffusion coefficient and cerebral blood volumen in the rat brain: a magnetic resonance study. *J Neuroscience* 20 (21): 8153-8159, 2000.
 22. Ben- Nathan D., Maestroni G.J., Lusting S., Conti A. Protection by Melatonin in mice infected with Semliki forest virus. *Adv Pineal Res*: 7 John Libbey and Company LTD eds. Pp: 125-130, 1994.
 23. Ben- Nathan D., Maestroni G J., Lusting S., Conti A. Protective effects of Melatonin in mice infected with encephalitis viruses. *Arch Virol*. 140: 223-230, 1995.
 24. Benenson A. Manual para el control de las Enfermedades Transmisibles. *Publicación Científica* N° 564 O.P.S 16ta Edición 144-145, 501-512, 1997.
 25. Bennett J., Plum F., Cecil D. *Tratado de Medicina Interna*.

- MaGraw Hill Interamericana s.a de c.v, 20° Edición, 2005-2092, 1996.
26. Bernhardt R. Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿Apoptosis o necrosis? *Rev. Chil. Neuro-psiquiat.* 42(4):281-292, 2004.
 27. Bezzi P., Domercq M., Brambilla L., Galli R., Schols D., De Clercq E et al. CXCR4- activated astrocyte glutamate release via TNF alpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci.* 4:702- 710, 2001.
 28. Biber K., Neumann H., Inoue K., Boddeke HW. Neuronal "On and Off" signals control microglia. *Trends Neurosci.* 30:596-602, 2007.
 29. Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Molecular Endocrinology.* 13 (12):2025 -38, 1999.
 30. Boise L.H., Winn AJ., Thompson CB. Receptores that regulate T-cell susceptibility to apoptotic cell death. *Ann NY Acad Sci.* 766: 70-80, 1995.
 31. Bonilla E., Rodón C., Valero, N., Pons, H., Chacín-Bonilla, L., García, J., Rodríguez, Z., Medina-Leendertz, S., Añez, F. Melatonin prolongs survival of immunodepressed mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 95: 207-210, 2001.
 32. Bonilla E., Valero N., Chacín-Bonilla L., Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. *J Pineal Res.* 36(2): 73-9. 2004.
 33. Bonilla E., Valero N., Chacín-Bonilla L., Pons H., Larreal Y., Medina-Leendertz S., Espina L. Melatonin increases Interleukin-1 β and decreases Tumor Necrosis Factor Alpha in the brain of mice infected with the Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. *Neurochemical Research.* 28(5): 687-692, 2003.
 34. Bonilla E., Valero-Fuenmayor N., Pons H., Bonilla-Chacín, L. Melatonin protects mice infected with Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. *Cell Mol Life Sci.* 53: 430-434, 1997.
 35. Bouillet P. and Strasser A. BH3-only proteins-evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci.* 115(8): 1567-74, 2002.
 36. Broker, L.E., Kruyt, F. A., and Giaccone, G. Cell death independent of caspases. *Clin. Cancer. Res.* 11(9):3155-62, 2005.
 37. Burgués Gasió J.P., Moreno P., Vera C.D., Jimenez Cruz J.F. Mecanismo del ciclo celular y la apoptosis implicadas en la

- resistencia a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. **Actas urol. Esp.** 29(9): 846-859, 2005.
38. Calisher C., Kinney R., Monath B. identification of a new Venezuelan equine Encephalitis virus from Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 2(4): 1260-1272, 1982.
39. Calisher C., Shope R., Brandy W., Wrebe M. Propose antigenic classification of registred Arboviruses, Togaviridae, Alfavirus. **Intervirolgy** 14: 229-323, 1980.
40. Carson MJ., Bilousova TV., Puntambekar SS., Melchior B., Doose JM., Ethell IM. A rose by any other name? The potential consequences of microglial heterogeneity during CNS health and disease. **Neurotherapeutics.** 4:571-579, 2007.
41. Caroleo M.C., Frasca D., Nistico G., Doria G. Melatonin as immunomodulador in immunodeficient Mice. **Immunopharmacol.** 23: 81-89, 1992.
42. Cascales A. Maria. Bases moleculares de la apoptosis. **Anal. Real Acad Nal Farm.** 69(1):36-64, 2003.
43. Castedo M., Perfettini J.L., Roumier T., Andreau K., Medema R and Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene.** 23(16): 2825-37, 2004.
44. Castro A., Jimenez W., Claria J., Ros J., Martinez JM., Bosch M., Arroyo V., Plulats J., Rivera F., Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. **Hepatology,** 18:367-72, 1993.
45. Cauwels A., Janssen B., Waeytens A., Cuvelier C and Brouckaert P. Caspase inhibition causes hypercute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. **Nat Immunol.** 4(4): 387-93, 2003.
46. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Informe Epidemiológico sobre Encefalitis equina. Río de Janeiro. **Panaftosa.** 8-15, 1994.
47. Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ, Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. **Cellular Signalling** 14(3):249-57, 2002.
48. Chan WY., Kohsaka S., Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. **Brain Res Rev.** 53:344-354, 2007.
49. Chang HM., Tseng CY., Wei IH., Lue JH., Wen CY., Shieh JY., Melatonin restores the cytochrome oxidase reactivity in the nodose ganglia of acute hypoxic rats. **J. Pineal Res.** 39(2):206-14, 2005.
50. Cheng J., Zhou T., Liu Ch., Shapiro J. P., Braver M. T., Kiefer

- M. F., Barr P. J., Mountz J.D. Protection from Fas- Mediated Apoptosis by a soluble form of the molecule. **Science**. 263: 1759-62, 1994.
51. Cherwinski H.M., Murphy C.A., Joyce B. L., Bigler M.E., Song Y.S., Zurawski S.M., Moshrefi M.M., Gorman D.M., Miller K.L., Zhang S., Sedgwick J.D. and Phillips J.H. The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. **J Immunol**. 174(3): 1348-56, 2005.
52. Chiarugi P. and Giannoni E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. **Biochem Pharmacol**.
53. Chittenden T., Harrington E.A., O'Connor R., Flemington C., Lutz R. J., Evan G. I. and Guild B.C. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. **Nature**. 374(6524): 733-6, 1995.
54. Clark D.A., Keil A., Chen Z., Markert U., Manuel J. and Gorczynski R.M. Placental trophoblast from successful human pregnancies expresses the tolerance signaling molecule, CD200 (OX-2). **Am J Reprod Immunol** 50(3): 187-95, 2003.
55. Claustrat B., Brun J., Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev**. 9(1):11-24, 2005.
56. Clement M.V., Stamenkovic I. Fas and tumor necrosis factor receptor- mediated cell death: Similarities and distinctions. **J. Exp. Med**. 180: 557-67, 1994.
57. Colombo L., Chen G.J., López M.C., Watson R. Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. **Immunol Letters**. 33: 123-126, 1992.
58. Cotman W.C., Cribbs H.D., Pike J.C., Ivins J.K. Cell death in Alzheimer's disease en When Cells Die. Wiley- liss Publication. Edición New York. 385-409, 1998.
59. Coyle Dennis. Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. **Glía**. 23: 75-83, 1998.
60. Cuesta A., Cerezuela R., Esteban MA., Meseguer J. In vivo actions melatonin on the innate immune parameters in the teleost fish gilthead seabream. **J Pineal Res**. 17:1888-1895, 2008
61. Degterev A., Óbice M and Yuan J. A decade of caspases. **Oncogene**. 22(53):8543-67, 2003.
62. De La Hoz F. Encefalitis Equina Venezolana. MVZ-Cordoba 5(1): 18-22, 2000.
63. Dickerman R., Scherer W., Diaz-Najera A. Ecologic studies of Venezuela encephalitis virus in southeastern México. I. Induction and study sites, **Am J Trop Med Hyg**, 20: 730-739, 1971.

64. Dickson DW., Mattiace LA., Kure K., Hutchins K., Lyman WD., brosnan CF. Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. **Lab Invest.** 64(2): 135-56, 1991.
65. Di Mascio P., Denes P., Garcia C. Ghost Protein damage by peroxynitrite and its protection by Melatonin. **Braz J Med Biol Res.** 33(1): 11-17, 2000.
66. Diniz JA., Da Rosa AP., Guzman H., Xu F., Xiao SY., Popov VL. Vasconcelos PF., Tesh RB. West Nile virus infection of primary mouse neuronal and neuroglial cells: The role of astrocytes in chronic infection. **Am J. Trop. Med. Hyg.** 75(4): 691-6, 2006.
67. Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArther M.J., Montgomery CA Jr., Butel J.S., Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. **Nature.** 356: 215-221, 1992.
68. Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology.** 345(1):67-9, 1998.
69. Dubocovich ML., Luzindole (N-0774): A Novel Melatonin Receptor Antagonist. **The Journal of Farmacology and Experimental Therapeutics.** 902-910, 1988.
70. Dubocovich, ML., Masana M., Iacob S., Sauri D., Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human MEL1a and MEL1b recombinant subtypes are used assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. **Archives of Pharmacology.** 355: 365-375, 1997.
71. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes. **Trends in Pharmacological Sciences.** 16(2): 50-56, 1995.
72. Dubocovich ML., Yun K., Al-ghoul WM., Benloucif S., Masana MI. Selective MT2 Melatonin receptor antagonists block Melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. **FASEB Journal.** 12(12):1211-1220, 2001.
73. Dubocovich M.L., Markowska, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin receptors in mammals. (Review) **Endocrine** 27:101-103, 2005.
74. Ejarque-Ortiz., Medina MG., Tusell JM., Pérez- González AP., Serratos J., Saura J. Upregulation of CCAAT/enhancer binding protein beta in activated astrocytes and microglia. **Glia.** 55:178-188, 2007.
75. Ejarque-Ortiz A., Tusell JM., Serratos J., Saura J. CCAAT/enhancer binding protein alpha is down-regulated by toll-like receptor agonists in microglial

- cells. *J Neurosci Res.* 85:985-993, 2007.
76. Elkabes S., DiCicco-Bloom EM., Black IB Brain microglia/macrophages express neutrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci Res.* 16:2508-2521, 1996.
77. Eskes R., Desagher S., Antonsson B and Martinou J.C. Bid induce the Oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.* 20(3): 929-35, 2000.
78. Espina LM., Valero N., Hernandez J., Mosquera J. Increased apoptosis and expression of tumor necrosis factor- alpha caused by infection of cultured human monocytes with dengue virus. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 68(1): 48-53, 2003.
79. Espino J., Bejarano I., Redondo P., Rosado J., Barriga C., Reiter R., Pariente J., Rodriguez A. Melatonin Reduces Apoptosis Induced by Calcium Signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and Bax activation. *J. Membrane Biol.* 233: 105-118, 2010.
80. Fadeel B., Orrenius S., Zhivitovsk B. Apoptosis in human disease: A new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun.* 266: 699-714, 1999.
81. Farinas C., Aloisi F., Meinel E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28:138-145, 2007.
82. Finkel H.T., Casella R.C. AIDS and cell death en When Cells Die.Wiley –Liss Publication. Edition New York. 289-318, 1998.
83. Finnochiaro L., Arzt E., Fernández S., Cristocuolo M., Nahomond VE., Serotonin and Melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cell: Stimulation by interferon-gamma as part of the immuno regulatory pathway. *J Interferon Res.* 8: 705-716, 1988.
84. Finnochiaro L., Nahmod V., Launay JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. *Biochem J.* 280: 727-731, 1991.
85. Frank P., Johnson K. An outbreak of Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Central American, evidence for exogenous source of a virulent virus subtype. *Am J Epidemiol* (3): 94-487, 1997.
86. FU KY., Light AR., Matsushima GK., Maixner W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res.* 825(1-2): 59-67, 1999.
87. Fujji S., Akaike T., Maeda H. Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology.* 256(2):203-12, 1999.

88. Gerschenson L., Rotello J. Apoptosis: A different type of cell death **Faseb J.** 6: 2450-2455, 1992.
89. Giannoulia-Karantana A., Vlachou., polychronopoulou S., Papassotiriou I., Chrousos GP. Melatonin and immunomodulation: connections and potential clinical applications. **Neuroimmunomodulation**, 13(3): 133-144, 2006.
90. Gilad E., Wong H., Zingarelli B., Virág L., O'Connor M., Salzman A., Szabó C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NF κ B activation. **Faseb J.** 12: 685-693, 1998.
91. Gilmore A.P. Anoikis. **Cell Death Differ** 12 Suppl 2: 1473-7, 2005.
92. González-Haba M. García-Mauriño S., Calvo R., Goberna JR., Guerrero JM., High-affinity binding of Melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). **Faseb J.** 9. 1331-1335, 1995.
93. Gorczynski R.M. Evidence for an immunoregulatory role of OX2 with its counter ligand (OX2L) in the regulation of transplant rejection, fetal loss, autoimmunity and tumor growth. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. 49(4): 303-9, 2001.
94. Gorman M.A., Orrenius S., Ceccatelli S. Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. **Neuror Report.** 9: R49-R55, 1998.
95. Green D.R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. **Cell.** 102(1): 1-4, 2000.
96. Griffiths G.J., Dubrez L., Morgan C. P., Jones N. A., Whitehouse J., Corfe B.M., Dive C. and Hickman J. A. Cell damage-induced conformational changes of the onset of apoptosis. **J Cell Biol.** 144(5): 903-14, 1999.
97. Guerrero JM., Calvo JR., Oscuna C., López-González MA. Binding of Melatonin by lymphoid cell in humans and rodents. **Adv Pineal Res.** 7: 109-117, 1994.
98. Guillemin Gilles J., Brew Bruce J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a Review of function and identification. **Journal of Leukocyte Biolog.** 75(3): 388-97, 2004.
99. Hammom W., Sather G., Arboviruses. **In diagnostic procedures for viral and rickettsial infection**, Lennette, A. & Smichdt, N. J. (editors). New York: American Public Health Association. 227-280, 1969.
100. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia.** 40:140-155, 2002.
101. Hanisch UK., Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci.** 10:1387-1394,2007.
102. Harada H., Becknell B., Wilm M., Mann M., Huang L.J., Taylor S.S.,

- Scott J.D and Korsmeyer S. J. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase **A. Mol Cell.** 3(4): 413-22, 1999.
103. Hetts Ws. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. **JAMA.** 279: 300-307, 1998.
104. Heumann R., D. Lindholm, C. Bandtlow, M. MeyerM.J. Radeke, T.P. Misko, E.M. Shooter and H. Thoenen. Differential regulation of m RNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration and regeneration: Role of macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 84: 8735-8739, 1987.
105. Ho MK, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS, Wong YH. Galpha (14) links a variety of G (i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. **British Journal of Pharmacology.** 132(7):1431-40, 2001.
106. Hoek R.M., Ruuls S.R., Murphy C.A., Wright G.J., Goddard R., Zurawski S.M., Blom B., Homola M.E., Streit W.J., Brown M.H., Barclay A.N. and Sedgwick J.D. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). **Science.** 290 (5497): 1768-71, 2000.
107. Humbert W., Pevet P. The decrease of pineal Melatonin production with Age. **Ann NY Acad Sci.** 43-63, 1993.
108. Jang MH., Jung SB., Lee MH., Kim CJ., Oh YT., Kang I., Kim J., Kim EH. Melatonin attenuates amyloid beta 25-35 induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. **Neurosci Lett.** 380(1-2):26-31, 2005.
109. Jan Y., Matter M., Pai J.T., Chen Y.L., Pilch J., Komatsu M., Ong E., Fukuda M and Ruoslahti E. A mitochondrial protein, Bit 1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. **Cell.** 116(5):751-62, 2004.
110. Jenmalm M.C., Cherwinski H., Bowman E.P., Phillips J.H. and Sedgwick J.D. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. **J Immunol.** 176(1): 191-9, 2006.
111. John GR., Lee SC., Brosnan CF. Cytokines: Powerful regulators of lial cell activation. **Neuroscientist.** 9:10-22, 2003.
112. Jones MP, Melan MA, Witt-Enderby PA. Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. **Cancer Letters.** 151(2):133-43, 2000.
113. Kilic E., Kilic U., Reiter RJ. Bassetti CL., Hermann DM. Tissue-plasminogen activator – induced ischemic brain injury is reversed by melatonin: role of iNOS and Akt. **J pineal.** 39:151-155,2005.

114. Kitamura T., Tsuchihashi Y., Tatebe A., Fujita S. Electron microscopic features of the resting microglia in the rabbit hippocampus identified by silver carbonate staining. **Acta Neuropathol.** 38:195-201, 1977.
115. Kleinschmidt MC., Michaelis M., Ogbomo H., Doerr HW., Cinatl J Jr. Inhibition of apoptosis prevents West Nile virus induced cell death. **BMC. Microbiol.** 7: 49, 2007.
116. Koning N., Bo L., Hoek R.M. and Huiting I. Downregulation of macrophage inhibitory molecules in multiple sclerosis lesions. **Ann Neurol.** 62(5): 504-14, 2007.
117. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends Neurosci.** 19:312-318, 1996.
118. Kunduzova O., Ghislaine E., Seguelas M., Delagrangé P., De La Farge F., Cambon C. and Parini A. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. **The FASEB J.** Published online 2003.
119. Kuwana T., Mackey M.R., Perkins G., Ellisman M.H., Latterich M., Schneider R., Green D.R. and Newmeyer D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. **Cell.** 111(3): 331-42, 2002.
120. Ladeby R., Wirenfeldt M., García-ovejero D., Fenger C., Dising-Olesen L., Dalmau et al. Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. **Brain Res Brain Res Rev.** 48: 196-206, 2005.
121. Lahiri D., Ghosh C. Interactions between Melatonin, reactive oxygen species, and nitric oxide. **Annals of the New York Academy of Science** 893: 325-330, 1999.
122. Lanave S. and Saccone C. Comparative genomics: The evolutionary history of the Bcl-2 family. **Gene.** 333: 71-79, 2004.
123. Larreal F., Godoy O., Montiel L., Sanchez N. Encefalitis Equina Venezolana, crónica de una epidemia, Venezuela M.S.A.S. **Dir Vig Epid.** 1-5, 1996.
124. Lawson LJ.; Perry VH., Dri P., Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience.** 39: 151-170, 1990.
125. Lee G., Dallas S., Hong M., Bendayan R. Drug transporters in the central nervous system: Brain Barriers and Brain parenchyma considerations. **Pharmacol Rev.** 53:569-596, 2001.
126. Lee S., Chilton E., Pak JM. Adenosine receptor blockade reduces splanchnic hyperemia in cirrhotic rats. **Hepatology.** 15:1107-11, 1992.

127. Lesnikov V., Korneva A. The involvement of pineal gland and Melatonin in immunity and aging: II Thyrotropin-releasing hormone and Melatonin forestall involution and promote reconstitution of the thymus in anterior hypothalamic area (AHA)- lesioned mice. *Inter J Neurosci.* 62: 141-153, 1992.
128. Liang XH., Goldman JE., Jian H. Resistance of interleukin- 1 β -deficient mice to fatal Sindbis virus encephalitis. *J Virol.* 73: 152: 2563-2567, 1999.
129. Lin JJ., Sun YJ., Zhu DY., Osuna C., Guerrero J. Inhibición of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. *J. Virol.* 71(7):5227-5235,1997.
130. Linthicum G., Gordon S. Comparative infections of epizootic and enzootic of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in Amblyoma cajenense. *J Med. Entomol* (295): 827-831, 1992.
131. Lissoni P., Brivio F., Bani S. Low dose subcutaneous interleukin 2 therapy in association with the pineal indole Melatonin in treating AIDS. Abstract. Recent Advances in Chemotherapy, 18th International Congress of Chemotherapy. 769-770, 1993.
132. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron.* 19(1): 91-102, 1997.
133. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., et al. Biología celular y molecular. 4a edición Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid, 924-930 y 935-970, 2005.
134. López-González MA., Calvo JR., Oscura C., Guerrero JM. Interaction of Melatonin with human lymphocytes: Evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. *J Pineal Res.* 12: 97-104, 1992.
135. Lossi L., Merighi A. "In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS". *Progress in Neurobiology.* 69: 287-312, 2003.
136. Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *European Journal of Pharmacology.* 430(2-3):351-7, 2001.
137. Ludwing R., Newhouse V. Epidemic Venezuelan Equine Encephalitis in North America: Summary of virus- vector host relation. *Am J Epidemiol.* 101 (1): 3-15, 1975.

138. Lyons A., Downer E., Crotty S., Nolan Y., Mills K., Lynch M. CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4. **J Neurosci.** 27(31):8309-8313, 2007.
139. Maestroni GJ. T- helper 2 lymphocytes as peripheral target of Melatonin signaling. **J Pineal Res.** 18: 84-89, 1995.
140. Maestroni GJ. Therapeutic potential of Melatonin in immunodeficiency states, viral diseases and cancer. **Adv Exp Med Biol.** 467: 217-226, 1999.
141. Maestroni GJ., Conti A. The pineal neurohormone Melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1 +cell to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties. **J Neuroimmunol.** 28 (2): 167-176, 1990.
142. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of Melatonin modulates the antibodies response and antagonize the immunosuppressive effect of corticosterone. **J Neuroimmunol** 13: 19-30, 1986.
143. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opitergic mechanism. **Immunology.** 63(3): 465-469, 1988.
144. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiategic mechanism. **Clin Exp Immunol** 68, 384-391, 1987.
145. Maestroni GJ., Convacci V., Conti A. Hematopoietic rescue via T-cell dependent, endogenous Granulocyte- Macrophage colony Stimulating Factor induced by the pineal neurohormone Melatonin in tumor bearing mice. **Cancer Res** 54: 2429-2432, 1994.
146. MacKenzie RS, Melan MA, Passey DK, Witt-Enderby PA. Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. **Bio-chemical Pharmacology.** 63(4):587-95, 2002.
147. Malhotra S., Sawhney G., Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. **Med Gen Med.** 6(2):46, 2004.
148. Marani M., Hancock D., Lopes R., Tenev T., Downward J and Lemoine N.R. Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. **Oncogene.** 23(14):2431-41, 2004.
149. Matter M.L and Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha 5 beta 1 and alpha (V) beta 3 integrins that elevates bcl-2 transcription. **J Biol Chem.** 276(30): 27757-63, 2001.

150. Marianneau P., Flamand M., Deubel V., Despres P. induction of programmed cell death (apoptosis) by dengue virus *in vitro* and *in vivo*. ***Acta Cientifica Venezolana***. 49 suppl 10: 13-7, 1998.
151. Mark J., Andrew H. Apoptosis: Mechanismo and Roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 15: 223-49, 1993.
152. Martinou J.C and Green D.R. Breaking the mitochondrial barrier. ***Nat Rev Mol Cell Biol.*** 2 (1): 63-7, 2001.
153. Martz E., Howell D. Virus control cells first and cytolytic cell second. ***Immunol Today.*** 10:79-86, 1989.
154. Marquette C., Van Dam Am., Ceccaldi PE. Induction of immunoreactive interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in the brains of rabies virus infected rats. *J Neuroimmunol.* 68: 45-51, 1996.
155. Mathews J., Roehrig J., Specificity of the murine T- helper cell immune response to various alphavirus. ***I Gen Virol.*** 70: 2877-2886, 1989.
156. Mathiasen I.S., Sergeev I.N., Bastholm L., Elling F., Norman A.W and Jaattela M. Calcium and calpain as key mediators of apoptosis -like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. ***J Biol Chem.*** 277(34): 30738-45, 2002.
157. McGeer E. and McGeer P. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer diseases. ***Experimental Gerontology.*** 33:371-378, 1998.
158. McGeer EG., McGeer PL. Innate immunity in Alzheimers disease: a model for local inflammatory reactions. ***Mol Interv.*** 1: 22-29, 2001.
159. McIntyre K., Stepan K., Kolinsky W., Benjamin W., Killian P. Inhibition of IL-1 binding and bioactivity *in vitro* and modulation of acute inflammation *n vivo* by IL-1 receptor antagonist an anti-IL-1 receptor monoclonal antibodies. ***J Exp Med*** 173: 931-939, 1991.
160. McWhirter J.R., Kretz-Rommel A., Seven A., Maruyama T., Potter K.N., Mockridge C.I., Ravey E.P., Qin F. and Bowdish K.S. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. ***Proc Natl Acad Sci USA.*** 103(4): 1041-6, 2006.
161. Medina S., Valero N., Chacin-Bonilla L., Añez F., Giraldoth D., Arias J., Espina G., Díaz S. And Bonilla E. High intensity Light increases olfactory bulb Melatonin in Venezuelan Equine Encephalitis virus infection. ***Neurochemical Research.*** 26(3): 231-234, 2001.
162. Medina S., Valero N., Chacin-Bonilla L., Añez F., Giraldoth D., Arias J., Espina G., Young A., Bonilla E. Exposure to 2500 lux

- increases serum Melatonin in Venezuelan Equine Encephalomyelitis. **Neurochemical Research**. 24(6): 775-778, 1999.
163. Mei G. Sun., James Williams., Cristina Muñoz- Pinedo., Guy A. Perkins. , Joshua M. Brown., Mark H. Ellisman., Douglas R. Green and Terrence G. Frey. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals. Transformation of mitochondria during apoptosis. **Nature cell Biology**. 9(9): 1057-1065, 2007.
164. M. H. Jang., S. B. Jung., M. H. Lee., C. J. Kim., Y. T. Oh., I. Kang., J. Kim., E. H. Kim. Melatonin attenuates amyloide beta₂₅₋₃₅ induced apoptosis in mouse microglial BV2 cells. **Neuroscience Letters**. 380:26-31, 2007.
165. Michaelis M, Kleinschmidt MC, Doerr HW, Cinatl J Jr. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. **J. Antimicrob Chemother**. 60(5):981-6, 2007.
166. Min-Yang Lee, Yu-Hsiang Kuan, Hung -Yi Chen, Tsung-Ying Chen, Shur-Tzu Chen, Chien-Chih Huang, I-Ping Yang, Yun-Shan Hsu, Tian-Shung Wu and E-Jian Lee. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats. **J. Pineal. Res**. 42: 297-309, 2007.
167. Mishra MK, Basu A. Minocycline neuroprotects, reduces microglial activation, inhibits caspase 3 induction, and viral replication following Japanese encephalitis. **J. Neurochem**. 105(5): 1582-95, 2008.
168. Molinari EJ, North PC, Dubocovich ML 2-[125I] iodo-5-methoxycarbonylamino-N-acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2 binding sites. **European Journal of Pharmacology**. 301(1-3):159-68, 1996.
169. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**. 329:2002-12, 1993.
170. Montaña L., Chávez F. Respuesta inmune, innata y adaptativa: ¿Son los TLRs el eslabón perdido?. **Rev Fac Med UNAM**. 51(2):60-62,2008.
171. Moreaux J., Veyrune J.L., Reme T., De Vos J. and Klein B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. **Biochem Biophys Res Commun**. 366(1): 117-22, 2008.
172. Morrey K., Mclachlan A., Serkin C., Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone Melatonin. **J Immunol**.153: 2671-2680, 1994.
173. Morse S.; Schluederberg T. Emerging viruses the evolution of viruses and viral diseases. **J Infect Dis**. (162): 1-7, 1990.
174. Mott Rt., Ait-Ghezala G., Town T., Mori T., Vendrame M., Zeng J. et

- al. Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. **Glia**. 46:369-379, 2004.
175. Muñoz C., Carrion A., Goldstein J., Fitzgerald P., newmeyer D., and Gren D. Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration. **PNAS**. 103(31): 11573-11578, 2006.
176. Nakano K and Vousden K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Mol Cell**. 7(3): 683-94, 2001.
177. Nava, F.; Calapai, G. Melatonin effects on inhibition of thirst and fever induced by lipopolysaccharide in rat. *Eur J Pharmacol*. 331: 267-274,1997.
178. Negrette, B., Bonilla, E., Valero, N., Pons, H., García, J., Chacín-Bonilla, L., Medina-Leendertz, S., Añez, F. Melatonin treatment enhances the efficiency of mice immunization with Venezuelan equine encephalomyelitis virus TC-83. **Neurochemical Research**. 26(7): 765-768, 2001.
179. Neri B., De Leonardis V., Gemelli M. T., Di Loro F., Mottola A., Ponchietti R., Raugei A., Cini G. Melatonin as biological response modifier in cancer patient. **Anticancer Res**. 27. 159-163, 1998.
180. Neumann H. Control of glial immune function by neurons. **Glia**. 6(2): 191-9, 2001.
181. Nimmerjahn A., Kirchhoff F., Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**. 308:1314-1318,2005.
182. Noda Y., Mori A., Liburdy R., Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J Pineal Res**. 27: 159-163, 1999.
183. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **Journal of Biological Chemistry**. 275 (40):31311-7, 2000.
184. Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2, Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical Pharmacology**. 61(11):1369-79, 2001.
185. Okada H and Mak T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**. 4(8): 592-603, 2004.
186. Olivier P., Fontaine R., Loron G., Van Streenwinkel J., Biran V., Massonneau V., Kaindl A., Dalous J., Gressens P. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter

- in neonatal rats. *Plos One*. 4(9): 1-13, 2009.
187. Organización Panamericana De La Salud (OPS). Sistema de información y vigilancia epidemiológica de la Encefalitis Equina Venezolana en la región de las Américas. *Rev Panam Salud Pública*. 6 (2): 128-138, 1999.
188. Orrenius S. Apoptosis: molecular mechanism and implications for human disease. *J Int Med*. 237:529-536, 1995.
189. Ortega C., Diaz M., Avalos A., Vergara M., Rosales A. La apoptosis y su importancia Biomédica. *Gac Med Mex*. 137(6): 563-77, 2001.
190. Paredes SD., Terron MP., Marchena AM., Barriga C., Pariente JA., Reiter RJ., Rodriguez AB. Tryptophan modulates cell viability, phagocytosis and oxidative metabolism in old ringdoves. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 07:101 (1):56-62, 2007.
191. Paternoster L., Radogna F., Accorsi A., Alberti M., Guadandi G. and Ghibelli L. Melatonin as modulator of apoptosis in B-Lymphome cells. *Ann NY. Acad. Sci*. 1171: 345-349, 2009.
192. Pedreaañez A., Rincón J., Romero M. Viera N. and Mosquera J. Melatonin decreases apoptosis and expression of apoptosis- associated proteins in acute puromycin aminonucleosis nephrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 0: 1-8, 2004.
193. Pérez A., Guardo AC., Rossi NE., Recio ML., Reine J., Regueiro JR. El complejo TCR/CD3: Especificidad con flexibilidad. *Inmunol*. 25(1):50-56, 2006.
194. Perfettini J.L. and Kroemer G. caspase activation is not death. *Nat Immunol*. 4(4): 308-10, 2003.
195. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3V-5V-monophosphate pathway. *Biochemical Pharmacology*. 58(4):633-9, 1999.
196. Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intra-ocular pressure in rabbits. *European Journal of Pharmacology*. 416(3):251-4, 2001.
197. Pioli C., Carleo C., Nistico G., Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and nonspecific signal for t-cell proliferation. *Int J Immunopharmacol*. 15: 463-468, 1993.
198. Pocok JM., Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*. 30: 527-535, 2007.
199. Poon, AM.; Liu, ZM.;Pang, CS. Evidence for a direct action of

- melatonin on the immune system. **Biol Signals**. 3: 107-117, 1994.
200. Pozo D., Reiter Rj., Calvo Jr. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by Melatonin via complex calmodulin. **J Cell Biochem**. 65: 430-442, 1997.
201. Puthalakath H., Huang D.C., O'Reilly L.A., King S. M and Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. **Mol Cell**. 3(3):287-96, 1999.
202. Quiroz Y., Ferrebuz A., Romero F., Vaziri N and Rodriguez B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. **Am J Physiol Renal Physiol**. 294: F336- F344, 2008.
203. Rabinowitz S., Adeler W. Host defense during primary Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection in mice. **J Immunol**. 110 (5): 1345-1353, 1973.
204. Rafii-El-Idrissi, M.; Calvo, JR.; Harmouch, A. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. **J Neuroimmunol**. 86: 190-197, 1998.
205. Raivich G., Banati R. Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. **Brain Res Rev**. 46: 261-281, 2004a.
206. Raivich G., Bohatschek M., Kloss CU., Werner A., Jones LL., Kreutzberg Gw. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Res. Brain Res. Rev**. 30: 77-105, 1999.
207. Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L, Hill SM. Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. **Cancer Letters**. 179 (2): 141-50, 2002.
208. Ramírez-Expósito MJ., Martínez-Martos JM. Estructura y funciones de la microglia en el SNC. Respuesta a procesos degenerativo. **Rev. Neurol**. 26(152): 600-611, 1998.
209. Ravagnan L., Gurbuxani S., Susin S. A., Maise C., Daugas E., Zamzami N., Mak T., Jaattela M., Penninger J. M., Garrido C and Kroemer G. Heatshock protein 70 antagonizes apoptosis- inducing factor. **Nat Cell Biol**. 3(9): 839-43, 2001.
210. Reed L., Muench M. A simple method of stimulating fifty percent end points. **Amer J Trop Med Hyg**. 27: 493-497, 1938.
211. Redding P.J and Juliano R.L. Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. **Cancer Metastasis Rev**. 24(3): 425-39, 2005.

212. Reginato M.J., Mills K.R., Paulus J. K., Lynch D.K., Sgroi D. C., Debnath J., Muthuswamy S. K and Brugge J.S. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro- apoptotic protein Bim to prevent anoikis. **Nat Cell Biol.** 5(8): 733-40, 2003.
213. Reiter R. Functional pleiotropy of the neurohormone Melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. Abstract. Front **Neuroendocrinol.** 6 (4): 383-415, 1995.
214. Reiter R. Melatonin: Lowering the High price of free radicals. **New in physiological Science.** 15(5): 246-250, 2004.
215. Reiter R., Guerrero J., Garcia J., Acuña-Castroviejo J. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and ageing relation to Melatonin. **Annals of the New York Academy of Science.** 854: 410-424, 1998.
216. Reiter R.J. Melatonin Synthesis: Multiplicity of regulation. **Kynurenine and Serotonin Pathways.** Plenum press N.Y. 149-158, 1991.
217. Ricco-Hesse R., Roerhing J., Dickerman R. Genetic Variation of Venezuelan Equine Encephalitis virus strain of the I-D Variety in Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** 38(1): 195-204, 1988.
218. Rijkers E.S., de Ruiter T.m Buitenhuis M., Veninga H., Hoek R.M. and Meyaard L. Ligation of CD200R by CD220 is not required for normal murine myelopoiesis. **Eur J Haematol.** 79(5):410-6, 2007.
219. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA, Gusella JF. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. **Proc Natl Acad Sci USA.** 92(19): 8734 -8, 1995.
220. Romero F., Bosch-Morell F., Romero M., Jareno E., Romero E., Marin N., Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ Health Perspect.** 106 (5): 1229-34, 1998.
221. Rosato R., Macasaet F., Jahrling PB. Enzyme-linked immunosorbent assay detection of immunoglobulins G and M to Venezuelan equine encephalomyelitis virus in vaccinated and naturally infected humans. **J Clin Microbiol.** 26: 421-425, 1988.
222. Rosenblum M. D., Olasz E., Woodliff J. E., Jonson B. D., Konkol M. C., Gerber K. A., Orentas R. J., Sandford G. and Truitt R. L. CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. **Blood.** 103(7): 2691-8, 2004.
223. Ruíz A. Bases para la Instrumentación de un sistema de Información y Vigilancia Epidemiológica de la EEV en la región de las Américas México.

- OPS/HCP/HCV** (96/24) 1-23, 1997.
224. Scheld W., Arinstrong D., Hughes J. **Emerging Infections** ASM press. Washington D.C. 27-39, 1998.
225. Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. MT (1) Melatonin Receptor in the Human Retina: Expression and Localization. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 43(3):889-97, 2002.
226. Schoneboom B., Catlin K., Marty A., Grieder F. Inflammation is a component of neurodegeneration in response to Venezuelan Equine Encephalitis virus infection in mice. **J Neuroinmonol** 109 (2): 132-46, 2000.
227. Schwartz m., Butovsky O., Bruck W., Hanisc UK. Microglial phenotyp is the commitment reversible. **Trends Neurosci**. 29:68-74, 2006.
228. Shoshkes C., Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections?. **J. Virol**. 72(6):4547, 1998.
229. Skwarlo-Sonta K. Funtional connections between the pineal gland and immune system. **Acta Neurobiol** Exp. 56 (1): 341-357, 1996.
230. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. **J Vasc Res**. 31:131-43,1994.
231. Seung-Yun Chung and Seol-Heui Han. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. **J Pineal Res**. 34:95-102, 2003.
232. Shen X and Kramer R.H. Adhesion-mediated squamous cell carcinoma survival through ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor. **Am J Pathol**. 165(4): 1315-29, 2004.
233. Shibue T., Takeda K., Oda E., Tanaka H., Murasawa H., Takaoka A., Morishita Y., Akira S., Taniguchi T and Tanaka N. Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. **Genes Dev**. 17(18): 2233-8, 2003.
234. Shintani T and Klionsky D.J. Autophagy in health and disease: a doubleedged sword. **Science**. 306(5698): 990-5, 2004.
235. Simelyte E., Criado G., Essex D., Uger R. A., Feldmann M. and Williams R.O. CD200-Fc, a novel antiarthritic biologic agent that targets proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis. **Arthritis Rheum**. 58(4): 1038-43, 2008.
236. Skaper S., Floreani M., Ceccon M., Faccil L., Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress and the neuroprotective potencial of Melatonin. **Annals of the New**

- York Academy of Science.** 890: 107-118, 1999.
237. Skinner TM, Lopez-Corrales NL, Anderson SI, Loudon AL, Haley CS, Archibald AL. Genetic and physical mapping of the porcine melatonin receptor 1B gene (MTNR1B) to chromosome 9. **Cytogenetics and Cell Genetics.** 90(1-2):53-5, 2000.
238. Skrzydlewska E. Melatonin as an antioxidant. **Postepy Hig Med Dosw.** 55(6): 871-89, 2001.
239. Sonnerborg A., Carlin G., Akerlund B, Jarstrand C. Increased production of malondialdehyde in patients with HIV infection. **Scand bJ Infect Dis.** 20(3): 287-90, 1988.
240. Slaughter SA, Roca AL, Liebert CB, Altherr MR, Gusella JF, Reppert SM. Mapping of the gene for the Mel1a-melatonin receptor to human chromosome 4(MTNR1A) and mouse chromosome 8 (*Mtnr1a*). **Genomics.** 27(2):355 -7, 1995.
241. Sperandio S., Poksav K., de Belle I., Lafuente M.J., Liu B., Nasir J and Bredesen D. E. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. **Cell Death Differ.** 11(10): 1066-75, 2004.
242. Stankov B., Fraschini F., Reiter R. Melatonin binding sites in the central nervous system. **Brain Res Rev.** 16: 245-256, 1991.
243. Stence N., Waite M., Dailey E. Dynamics of microglial- activation: a confocal time- lapse analysis in hippocampal slices. **Glía.** 33: 256-266, 2001.
244. Strasser A., Vaux D.L. The molecular biology of apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 93: 2239-2244, 1996.
245. Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immuno competent cells of the CNS. **Glía.** 40: 133-139, 2002.
246. Streit WJ. Microglial cells. In: Kettenmamm H, Ramsom B., eds. **Neuroglia. Oxford: University Press.** 60-84, 2005.
247. Streit W.J., Code JR., Fendrick SE., Flanary BE., Mariani CL. Role of microglia in the central nervous systems immune response. **Neurol Res.** 27: 685-691, 2005.
248. Streit W.J, Sparks DL. Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. **J. Mol. Med.** 75: 130-138, 1997.
249. Streit W.J., Walter S. A., Pennell NA. Reactive microgliosis. **Prog. Neurobiol.** 57: 563-581, 1999.
250. Stuehr DJ., Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci USA.** 82:7738-42,1985.

251. S.Y. Chung and S. H. Han. Melatonin attenuates Kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J. Pineal Res.* 34: 95-102, 2003.
252. Takahashi M., Ishida T., Traub O., Corson MA., Berk BC. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J Vasc Res.* 34:212-219, 1997.
253. Tapia R., Pasantés H., Massieu L., Arias C. Mecanismos celulares y moleculares de la neurodegeneración. *Gac Med Mex.* 134: 685-703, 1998.
254. Taylor R.C., Cullen S.P and martin S.J: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Moll Cell Biol.* 9,10.
255. Terrones O., Antonsson b., Yamaguchi H. Wang H., Liu J., Lee R., Herrmann A., and Basañez G. Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and BAX and tBID. *J. of Biolog. Chemistry.* 279(29): 300081-30091, 2004.
256. Thomas W.E. Brain in macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res.* 17: 61-74, 1992.
257. Thongtan T., Cheepsunthorn P., Chaiworakul V., Rattanarungsan C., Wikan N., Smith DR. Highly permissive infection of microglial cells by Japanese encephalitis virus: a posible role as a viral reservoir. *Microbes Infect.* 12(1): 37-45, 2010.
258. Tikka T., Fiebich BL., Goldsteins G., Keinanen R., Koistinaho J. Minocycline a tetracycline derivative is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J. Neurosci.* 21: 2580-2588, 2001.
259. Todd Kathryn G., Butterworth Roger F. Early microglial response in experimental thiamine deficiency: An immunohistochemical analysis. *Glía.* 25: 190-198, 1999.
260. Town Terrence., Nikolic Veljko and Tan Juan. The Microglial "activation" continuum: From innate to adaptive responses. *J. Neuroinflammation.* 2:24, 2005.
261. Tsuda M., Shigemoto- Mogami Y., Koizumi S. Mizokoshi A., Kohsaka S., salter MW., Inove K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerver injury. *Nature.* 424 (6950): 778-83, 2003.
262. Valero N. Arbovirus de la región. *Invest Clin.* Vol. 37(1): 1-3. 1996.
263. Valero, N. La Melatonina: ¿mito o realidad?. *Invest Clin.* 39(4): 253-255. 1998.
264. Valero N., Añez F., Larreal Y., Arias J., Rodríguez Z., Espina L. Evaluación de la inmunidad contra el virus de Encefalitis Equina Venezolana y Dengue en la población humana de San

- Carlos, Municipio insular Almirante Padilla, Estado Zulia, Venezuela año 1996. *Invest Clin.* 42(3):161-169, 2001
265. Valero N., Bonilla E., Pons H. Melatonin induces changes to serum cytokines in mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96: 348-351, 2002.
266. Valero, N., Espina, LM., Añez, G., Torres, E., Mosquera, J. Short report: Increased level of serum nitric oxide, in patients with dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 66(6): 762-764. 2002.
267. Valero N., Espina LM., Bonilla E. and Mosquera J. Melatonin decreases nitric oxide production and lipid peroxidation and increases interleukin-1 beta in the brain of mice infected by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *J pineal Res.* 42:107-112, 2007.
268. Valero N., Espina LM., Mosquera J. Melatonin decreases nitric oxide production, inducible nitric oxide synthase expression and lipid peroxidation induced by Venezuelan equine encephalomyelitis virus in neuroblastoma cell culture. *Neurochem Res.* 31: 925-932, 2006.
269. Valero N., Henríquez R., Hernández C., Pomedá O., Romero M. Agentes virales en pacientes con procesos infecciosos del sistema nervioso central. *Invest Clin.* 42 (4): 255-267, 2001
270. Valero N., Meleán E., Bonilla E., Arias J., Espina L., Chacín-Bonilla L., Larreal Y., Maldonado M., Añez F. In Vitro, Melatonin treatment decreases nitric oxide levels in murine splenocytes cultured with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Neurochem Res.* 30(11): 1439-1442, 2005.
271. Valero N, Nery A, Bonilla E, Espina LM, Chacin-Bonilla L, Añez F, Maldonado M, Meleán E. Antagonistic effect of luzindole in mice treated with melatonin during the infection with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Neurochem Res.* 34(2):268-73, 2009.
272. Van Rossum D., Hanisch UK. Microglia. *Metab Brain Dis.* 19:393-411, 2004.
273. Viera N., Pedreañez A., Romero M., Rincón J., Mosquera J. Increased expression of apoptosis- associated proteins in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Invest. Clin.* 46(3), 2005.
274. Von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell and Tissue Research.* 309(1):151-62, 2002.
275. Walton M, Saura J., Young D., MacGibbon G., Hansen W., Lawlor P. et al. CCAAT enhancer

- binding protein alpha is expressed in activated microglial cells after brain injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 61:11-22, 1998.
276. Walton T., Grayson M. Venezuelan Equine Encephalomyelitis, the Arboviruses: *Epidemiology and Ecology*. Chap 46. Vol IV. 203-233, 1988.
277. Wang L.H., Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *Mt Sinai J Med.* 71(6):361-7, 2004.
278. Wang P., Valentiin A.J., Gilmore A. P and Streuli C.H. Early events in the anoikis program occur in the absence of caspase activation. *J Biol Chem.* 278(22): 19917-25, 2003.
279. Wang X. J., Ye M., Zhang Y. H. and Chen S.D. CD200-CD200R regulation of microglia activation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2(3):259-64, 2007.
280. Watkins LR., Maier SF. The pain of being sick: implications of immune- to- brain communication for understanding pain. *Annu Rev Psychol.* 51:29-57, 2000.
281. Watkins LR., Milligan ED., Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends in Neurosciences.* 24(8):450-455, 2001.
282. Weaver S., Bellew L., Ricco-Hesse R. Phylogenetic analysis of alphaviruses in the VEE complex and identification of the source of epizootic viruses. *Virology J.* 191: 282-290, 1992.
283. Weissenock H., Hornig M., Hickey WF., Lipkin WL. Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol.* 10(2):260-72, 2000.
284. Witt-Enderby PA, Jarzynka MJ, Melan MA. Microtubules modulate melatonin receptor function. *Neuroscience Abstracts.* 27:142, 2001.
285. Wright G., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., et al. Characterization of CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol.* 171(6):3034-46, 2003.
286. Wolfler A. Prooxidant activity of melatonin promotes fas- induced cell death in human leukemic Jurkat cells. *FEBS Letters.* 502:127-131, 2001.
287. Wu JJ., Chen X., Cao XC., Baker MS., Kaufman DB. Cytokine induced metabolic dysfunction of MIN6 beta cells is nitric oxide independent. *J Surg Res.* 101(2):190-5, 2001.
288. Xiong Huangui., Zeng Yong-Chun, Lewis Travis., Zheng Jialin., Persidsk Yuri and Gendelman Howard E. HIV infected mononuclear phagocyte secretory products affect neuronal physiology leading to cellular demise: relevance for HIV-1-associated dementia. *J. of*

- Neurobiology.** 6(1): S14- S23, 2000.
289. Yang Nc., Lu Lh., Kao Yh., Chau Ly. Hemo oxygenase-1 attenuates interleukin-1beta-induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. **J Biomed Sci.** 11(6):799-809, 2004.
290. Young S. L., Dawson W.C., Eliopoulos GA. Virus and apoptosis. **Br Med Bull.** 53:509-521, 1997.
291. Yrjanheikki J., Keinanen R., Pellikka M., Hokfelt T., Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc Natl Acad Sci USA.** 95(26): 15769-74, 1998.
292. Zamzami N and Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2(1): 67-71, 2001.
293. Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J and Korsmeyer S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X (L). **Cell.** 87(4): 619-28, 1996.
294. Zhang S. and Phillips J.H. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. **J Leukoc Biol.** 79(2): 363-8, 2006.
295. Zhang S., Cherwinski H., Sedgwick J. D. and Phillips J.H. Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. **J Immunol.** 173(11): 6786-93, 2004.
296. Zhao H, Poon AM, Pang SF. Pharmacological characterization, molecular subtyping, and autoradiographic localization of putative melatonin receptors in uterine endometrium of estrous rats. **Life Sciences.** 66(17):1581-91, 2000.
297. Zhao H, Pang SF, Poon AM. Mt (1) Receptor-mediated antiproliferative effects of melatonin on the rat uterine antimesometrial stromal cells. **Molecular Reproduction and Development.** 61(2):192-9, 2002.
298. Zhou j., Zhang s., Zhao X and Wei T. Melatonin impairs NADPH oxidase assembly and decreases superoxide anion production in microglia exposed to amyloid- β_{1-42} . **J. of pineal Research.** 45:157-165, 2008.
299. Zinder S., Bredt D. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American** 28-35, 1992.
300. Ziv Y., Ron N., Butovsky O., Landa G., Sudai E., Greenberg N. et al. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. **Nat Neurosci.** 9:268-275, 2006.
301. Zmasek C., Zhang Q., Ye Y. and Godzik A. Surprising complexity of the ancestral apoptosis network. **Genomic Biology.** 8: 12226-12233, 2007.

