

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

**REPLICACIÓN VIRAL Y PRODUCCIÓN DE ÓXIDO
NÍTRICO Y MALONDIALDEHÍDO EN CULTIVOS
CELULARES Y RATONES TRATADOS
PREVENTIVAMENTE CON MELATONINA,
MINOCICLINA Y ÁCIDO ASCÓRBICO
INFECTADOS POR EL VIRUS DE
ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA**

TESIS DOCTORAL

Jenny Salazar de Acosta

ALCALÁ DE HENARES, 2011

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



**REPLICACIÓN VIRAL Y PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y
MALONDIALDEHÍDO EN CULTIVOS CELULARES Y RATONES
TRATADOS PREVENTIVAMENTE CON MELATONINA, MINOCICLINA
Y ÁCIDO ASCÓRBICO INFECTADOS POR EL VIRUS DE
ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA**

TESIS DOCTORAL

Jenny Salazar de Acosta

DIRECTORES DE TESIS

Melchor Álvarez de Mon Soto

Catedrático de Medicina,
Universidad de Alcalá.

Nereida Valero

Catedrático de Medicina,
Universidad del Zulia.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios, por darme la oportunidad de existir y brindarme su bondad infinita en cada uno de mis sueños.
- A nuestra Ilustre Universidad del Zulia y a la Universidad de Alcalá, por permitirme recorrer este maravilloso camino de crecimiento profesional.
- Al Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, por abrirme sus puertas en el área de la investigación.
- A la Dra. Nereida Valero, por confiar en mí y brindarme un gran apoyo espiritual, de amistad y científico en cada paso de esta investigación, su esencia siempre la recordaré.
- Al Dr. Melchor Álvarez de Mon, por entrelazar estas prestigiosas Universidades, permitiendo así la consolidación de este programa de Doctorado, gracias una vez más por su orientación y conocimientos.
- Al personal de la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas, quienes me apoyaron y brindaron lo mejor de sí en todo momento.
- A mi amiga Alegria Levy, por ser quien es y estar siempre allí, compartiendo esta experiencia así como otras que hemos logrado luchando y perseverando. Lo mejor para tí siempre.

- A mi querida Prof. Zoila, por su apoyo, comprensión y amistad desinteresada en cada paso de mi vida. Sus palabras estuvieron presente en todo momento.
- A mi familia del Departamento de Morfofisiopatología por ser tan unidos e incondicionales, y a mis estudiantes quienes me llenan de alegría y entusiasmo.
- A mis adorados Padres, por darme el Don de la vida, su amor, comprensión y apoyo en cada uno de mis días. Su amor es inigualable.
- A mis hermanos Rafito, Juliana y Emily, por creer en mí y ser fuente de inspiración constante para emprender nuevas metas. Nuestro Angel de la guarda nos guía día a día.
- Al Principe de mis sueños por siempre Jose, mi esposo a quien tanto amo, eres mi complemento en cada instante de mi ser, arriesgándonos siempre llegamos a lo deseado, nuestra burbuja se fortalece mas y mas y con el pasar de los años seguiremos riéndonos de todo, Amo.

DEDICATORIA

A mis padres, Cira Elena y Rafael

A mi hermano y ángel de la guarda, Rafito

A mis hermanas, Juliana y Emily

Al Príncipe de mis sueños por siempre, Vida, Jose

Los Amo.

ÍNDICE

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	
Summary	
I.- Introducción	
I. 1.- Encefalitis Equina Venezolana	1
I. 2.- Agente etiológico	1
I. 3.- Epidemiología y ciclos evolutivos de la EEV	2
I. 4.- Patogénesis de la infección por el virus de EEV	7
I. 5.- Prevención y control	8
I. 6.- EEV, respuesta inmunitaria y mediadores oxidativos	9
I. 7.- Antioxidantes	17
I. 7.1- Melatonina	19
I. 7.1.1.- Estructura	20
I. 7.1.2.- MLT, receptores y antagonistas	25
I. 7.2.- Minociclina	29
I. 7.2.1.- Estructura	31
I. 7.2.2.- Propiedades de la MIN	31
I. 7.3.- Acido ascórbico	36
I. 7.3.1.- Características y su función antioxidante	37
I. 7.3.2.- Estructura	37
II.- Hipótesis y Objetivos	41
III.- Materiales y Métodos	45
III. 1.- Virus	46
III. 2.- Melatonina	47
III. 3.- Minociclina	48
III. 4.- Ácido ascórbico	48
III. 5.- Sistema <i>in vitro</i>	48
III. 5.1.- Cultivo de células de neuroblastoma múrido (Na ₂)	48
III. 5.2- Recolección de muestras	50
III. 6.- Determinación del título viral	50

III. 7.- Cuantificación de NO	51
III. 8.- Determinación de MDA	51
III. 9.- Determinación de proteínas	52
III. 10.- Infectividad viral por Inmunofluorescencia indirecta	52
III. 11.- Sistema <i>in vivo</i>	53
III. 11.1.- Animales	53
III. 11.2.- Ensayos <i>in vivo</i>	53
III. 11.3.- Recolección de muestras	55
III. 12.- Determinación de anticuerpos IgM anticuerpos anti-EEV	55
III. 13.- Análisis estadístico	56
IV.- Resultados	57
IV. 1.- Estudios <i>in vitro</i>	58
IV. 1.1.- Efecto de los antioxidantes sobre la replicación viral en cultivos de células de neuroblastoma m \acute{u} rido (Na ₂) infectados por el virus de EEV.	58
IV. 1.2.- Análisis del efecto de MLT, MIN y AA sobre la producción de NO en cultivos de células de neuroblastoma m \acute{u} rido (Na ₂) infectados por el virus de EEV utilizando diferentes dosis de tratamiento.	61
IV. 1.3.- Determinación de las concentraciones de MDA en cultivos de células de neuroblastoma m \acute{u} rido (Na ₂) infectados por el virus de EEV, tratados con MLT, MIN y AA utilizando diferentes dosis de tratamiento.	64
IV. 1.4.- Evaluación del efecto de los antioxidantes bajo tratamiento individual y combinado sobre la replicación viral en cultivos de células de neuroblastoma m \acute{u} rido (Na ₂) infectados por el virus de EEV.	66
IV. 1.5.- Análisis del efecto del tratamiento combinado de los antioxidantes sobre la producción de NO en cultivos de células de neuroblastoma m \acute{u} rido (Na ₂) infectados por el virus de EEV.	69

IV. 1.6.- Concentraciones de MDA en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na ₂) infectados por el virus de EEV bajo tratamiento combinado con MLT, MIN y AA.	71
IV. 2.- Estudios <i>in vivo</i>	73
IV. 2.1.- Evaluación del efecto en la sobrevida durante la infección por el virus de EEV utilizando tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA.	73
IV. 2.2.- Efecto de los antioxidantes sobre la replicación viral en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV.	75
IV. 2.3.- Determinación del efecto de la MLT, MIN y AA sobre la generación de NO en suero de ratones infectados por el virus de EEV.	78
IV. 2.4.- Concentraciones de MDA en suero de ratones infectados por el virus de EEV y pretratados con MLT, MIN y AA.	80
IV. 2.5.- Determinación del efecto del tratamiento combinado de los antioxidantes sobre la producción de NO en suero de ratones infectados por el virus de EEV.	82
IV. 2.6.- Determinación de las concentraciones de MDA en suero de ratones infectados por el virus de EEV bajo pretratamiento combinado con MLT, MIN y AA.	85
IV. 2.7.- Análisis del efecto de la MLT, MIN y AA sobre la producción de NO en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV.	87
IV. 2.8.- Concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV tratados con los antioxidantes.	89
IV. 2.9.- Efecto del tratamiento combinado de los antioxidantes sobre la producción de NO en homogeneizados cerebrales infectados por el virus de EEV.	93

IV. 2.10.- Determinación de las concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV bajo tratamiento combinado con MLT, MIN y AA.	94
V.- Discusión	98
VI.- Conclusiones	143
VII.- Bibliografía	145

ABREVIATURAS

Ácido ascórbico (AA)	Sintetasa de óxido nítrico (NOS)
Anión superóxido (O₂)	Sistema Nervioso Central (SNC)
Barrera hematoencefálica (BHE)	Solución Borato Salina con albúmina
Catalasa (CAT)	Bovina (BABS)
Células de neuroblastoma múrido (Na₂)	Solución Salina Fosfatada (PBS)
Células derivadas de fibroblastos de riñón de mono verde africano (VERO)	Subcutánea (s.c)
Dosis letal cincuenta (DL₅₀)	Unidades formadoras de placa por mL (UFP/mL)
Encefalitis Equina del Este (EEE)	Virus de Epstein-Barr (VEB)
Encefalitis Equina del Oeste (EEO)	
Encefalitis Equina Venezolana (EEV)	
Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA)	
Enzima superóxido dismutasa (SOD)	
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	
Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF-α)	
Interferón gamma (IFN-γ)	
Interleucina 1 beta (IL-1β)	
Intraperitoneal (i.p.)	
Lipopolisacárido (LPS)	
Luzindole (LZ)	
Malondialdehído (MDA)	
Melatonina (MLT)	
Microgramo/Kilogramo de peso (μg/Kg)	
Minociclina (MIN)	
Óxido nítrico (NO)	
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	
Post-infección (p.i.)	
Proteína C Reactiva (PCR)	
Sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS)	

SUMMARY

VIRAL REPLICATION AND NITRIC OXIDE PRODUCTION AND MALONDIALDEHYDE IN CULTURED CELLS AND MICE PREVENTIVE TREATED WITH MELATONIN, MINOCYCLINE AND ASCORBIC ACID INFECTED WITH THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS VIRUS

The Venezuelan Equine Encephalitis virus (VEE) has caused extensive epidemics throughout South America, especially Venezuela. Affecting, with high morbidity, the central nervous system (CNS) in humans and horses. On the other hand, there are antioxidants that interact with free radicals slowing the oxidation; among them are the Melatonin (MLT), Minocycline (MIN) and Ascorbic acid (AA). It is proposed to determine the effect in vitro and in vivo of the MLT, MIN and AA on viral replication, production of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) in cell cultures and mice infected with VEE virus. For in vitro assays murine neuroblastoma cells (Na2) were used, which received preventive treatment of individual and combined antioxidants doses as follows: MLT at 0.5 mM, 1.0 mM and 5.0 mM 30 minutes before infection, doses of MIN at 0.1 μ M, 0.2 μ M and 2.0 μ M 30 minutes before infection and dose of 25.0 μ M of AA, 50.0 μ M and 75.0 μ M 1 hour before viral infection. Infection with VEE virus was performed at a concentration of 1×10^6 PFU / ml in an atmosphere of 5% CO₂ and 37 °C. Supernatants were taken to determine NO, MDA and viral titers at 24 hours post-infection. In vivo assays were performed in NMRI albino mice which received individual and combined preventive treatment subcutaneously with 500 micrograms of MLT / kg of body weight, MIN 50 mg / kg body weight and 50 mg AA / kg body weight, from 3 days before viral infection. Mice were injected intraperitoneally with the Guajira strain (E-100) of the VEE virus as the experimental protocol. Animals on 1st, 3rd and 5th post-infection days, five mice per experimental group for each trial were sacrificed. Whole blood was recolected by orbital sinus puncture to obtain serum in which the IgM anti-VEE antibody titer NO concentration by Griess reaction and MDA by the thiobarbituric acid colorimetric method were determined. Subsequently, animals were sacrificed by cervical dislocation to obtain their brains after perfusion and make the determination of viral titers by plaque forming unit technique, NO and MDA. In cell cultures infected in vitro, a decrease ($p < 0.01$) in the production of NO and, MDA we

observed, likewise, it was shown a synergistic effect when using antioxidants in combination. These effects were not dose dependent. On the other hand, the viral replication in cells when treated with drugs was decreased. In brain homogenates and serum of infected animals there was an increase in the generation of NO ($p < 0.001$) in addition to the increased production of MDA, which decreased their levels when were treated with MLT, MIN and MLT combinations with AA and AA and MIN and MIN. In conclusion, prophylactic treatment with MLT, MIN and AA decreased viral titers in cell cultures, brain homogenates and serum being the combination of MLT and MIN the most effective, in turn, preventive treatment with MLT and AA but not with MIN, caused a decrease in the production of NO and MDA in experimental models of VEE virus infection in vitro and in vivo. These results support the development of preventive therapeutic strategies for VEE virus infection being MLT the preferred candidate because of its high tolerance.

Key words: *Venezuelan Equine Encephalitis, Melatonin, Minocycline, Ascorbic acid, Malondialdehyde, Nitric oxide, Cell Culture, Mice.*

I. INTRODUCCIÓN

I. 1.- Encefalitis Equina Venezolana

La encefalitis equina venezolana (EEV) es una enfermedad que se presenta principalmente en equinos y seres humanos siendo su característica la presencia de un cuadro febril que en ocasiones va seguido de compromiso neurológico y de muerte. El virus que ocasiona esta enfermedad fue aislado por primera vez de cerebro de caballos con encefalitis en Venezuela en 1939, aunque se sabe de un reporte previo en 1938 (Kubes et al., 1939; Beck et al., 1938).

I. 2.- Agente etiológico

El virus de la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) pertenece al género de los alfavirus (familia *Togaviridae*) con serotipos enzoótico y epizoótico. Dentro de este mismo grupo de virus se encuentran los de la Encefalitis Equina del Este (EEE) y la Encefalitis Equina del Oeste (EEO) (De la Hoz, 2000). Estas zoonosis son transmitidas por mosquitos, que se presentan en forma estacional causando epizootias en los équidos (caballos, mulas y burros) y brotes esporádicos en los humanos (Schäfer et al., 2011).

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).

El complejo taxonómico del virus de EEV, se ha clasificado en diferentes subtipos con sus respectivas variantes, de acuerdo a las características antigénicas, reacciones serológicas similares, exhibición de comportamiento biológico y distribución geográfica diferente, con relación a los huéspedes susceptibles y a las características patogénicas. El subtipo I tiene cinco variantes reconocidas, las variantes AB y C son las únicas que tienen un comportamiento biológico asociado a actividad epizootica en équidos y epidémica en humanos; las variantes ID, IE y IF y los subtipos II (variante similar a ID), III, IV, V y VI, se han asociado con actividad enzoótica (Mesa et al., 2005).

La EEV se caracteriza por afectar el Sistema Nervioso Central (SNC) en el 50% de los infectados, después de un periodo corto de incubación. Aquellos que no presentan compromiso neurológico presentan enfermedad febril indiferenciada (Acha y Szyfres, 1992). La enfermedad es endémica en la parte norte de América del Sur, en Trinidad y en América Central. Aparece en forma de epizootias, principalmente en la zona septentrional y occidental de América del Sur (De la Hoz, 2000).

I. 3.- Epidemiología y ciclos evolutivos de la EEV

El virus de EEV se transmite por la picadura de un mosquito infectado; dentro de las especies capaces de transmitir el virus tenemos el *Culex* (Melaconion), el *Aedes*, *Mansonia*, *Psorophora*, *Haemagogus*, *Sabethes*, *Deinoceritis* y *Anopheles* (De la Hoz, 2000). Los roedores, burros, caballos, el ganado vacuno, murciélagos,

posiblemente las aves y los perros, se consideran reservorios del virus de la EEV (Dickerman et al., 1971).

En la EEV se han identificado dos ciclos, el enzoótico (endémico) y el epizoótico (epidémico). En el ciclo enzoótico las variantes enzoóticas del virus se mantienen en el ambiente en niveles bajos, conservando una actividad continua y permaneciendo por períodos de tiempos indefinidos 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. Son generalmente incapaces de alcanzar altos niveles de replicación viral y causar brotes, a excepción de la variante IE, la cual ha ocasionado brotes en equinos (Weaver et al., 2004).

Este ciclo ocurre durante todo el año, ya que su presencia se ha podido demostrar mediante centinelización y aislamiento del virus en vectores y hospederos (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).

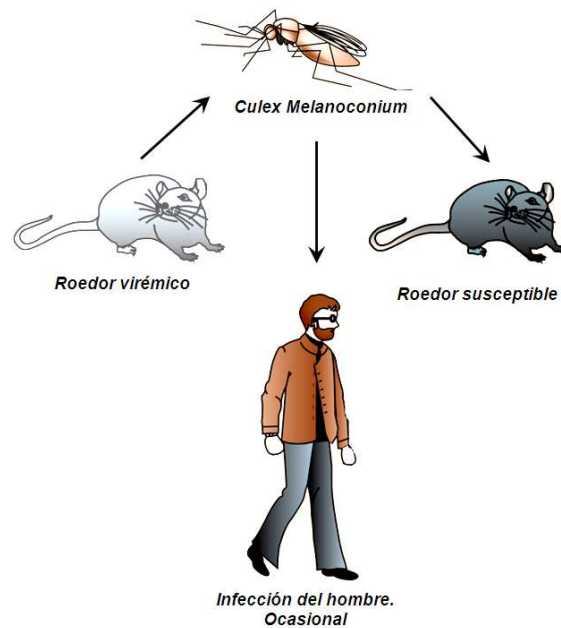


Figura 1. Representación esquemática del ciclo enzoótico o endémico. Adaptado de Weaver et al. 2004.

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 *mansania*, así como diferentes especies de los géneros *Aedes* y *Deinocerites pseudos*, que actúan como vectores (Ruíz, 1997). Los equinos representan a su vez el hospedador 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 un 19% y un 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).

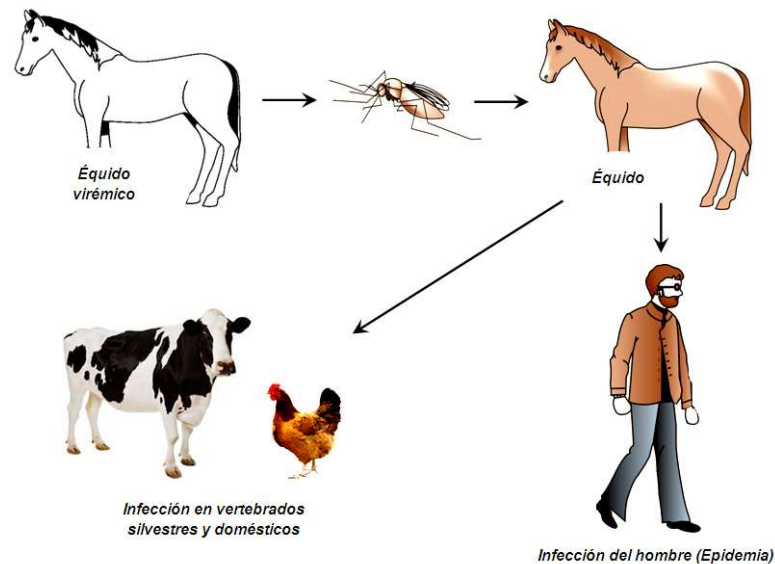


Figura 2. Ciclo epizootico o epidemico. Adaptado de Weaver et al. 2004.

En estudios realizados por Linthicum y Gordon (1992), se encontraron 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); Weaver et al., (2004), 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 epizooticas y enzoóticas (Tabla I). Todas infectan y confieren inmunidad a los équidos y al hombre, pero solo 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.

Tabla I. Clasificación del complejo viral de Encefalitis Equina Venezolana

Species	Serotype	Transmission pattern	Equine virulence	Location
Subtype I				
VEE virus	AB	Epizootic	Yes	Central, South and North America
VEE virus	C	Epizootic	Yes	South America
VEE virus	D	Enzootic	No	Central and South America
VEE virus	E	Enzootic	Variable	Central America and Mexico
Mosso das Pedras virus	F	Enzootic	Unknown	Brazil
Subtype II				
Everglades virus		Enzootic	No	Southern Florida
Subtype III				
Mucambo virus	A	Enzootic	No	South America
Tonate virus	B (also Bijou Bridge virus)	Enzootic	Unknown	South and North America
Mucambo virus	C (strain 71D1252)	Enzootic	Unknown	Western Peru
Mucambo virus	D (strain V407660)	Enzootic	Unknown	Western Peru
Subtype IV				
Pixuna virus		Enzootic	Unknown	Brazil
Subtype V				
Cabassou virus		Enzootic	Unknown	French Guyana
Subtype VI				
Rio Negro virus		Enzootic	Unknown	Northern Argentina

Fuente: Weaver et al. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. Nature Reviews Microbiology. 2004.

Esta enfermedad representa un problema de Salud Pública de gran importancia en Venezuela debido a que se ha presentado de manera epidémica y cíclica desde hace varios años. Es considerada uno de los principales agentes implicado en la producción de trastornos neurológicos durante los ciclos epizootodémicos, 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 indeterminados de équidos afectados (Valero et al., 2001), siendo el estado Zulia la región Venezolana más afectada. En esta zona se registro 11.072 casos humanos de EEV, provenientes de cinco municipios (Maracaibo, Mara, Insular Almirante Padilla, Páez y Miranda), con una incidencia del 1,92% y 15 muertes registradas (0,13%), según datos obtenidos del Departamento de Vigilancia Epidemiológica Regional del estado Zulia.

I. 4.- Patogénesis de la infección por el virus de EEV

Después de la picadura del mosquito infectado, el virus inicia una replicación bifásica: una fase periférica donde se multiplica en los tejidos locales y los ganglios regionales produciendo una viremia, seguido de una fase neutrópica donde 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 (Schäfer et al., 2011).

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 varia de 3 a 5 días, siendo los síntomas iniciales,

fiebre, inapetencia y depresión; seguidos por signos nerviosos 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 y 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 de encefalitis incluyen: fotofobia, convulsiones, rigidez del cuello y alteraciones de la conciencia. En las mujeres embarazadas puede ocasionar aborto o efectos teratogénicos en el feto (Frank y Johnson, 1997; Acha y Szyfres, 1992; Avilán, 1996; Benenson, 1997; Scheld et al., 1998).

I. 5.- 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 de virus vivos atenuados 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 han intentado desarrollar vacunas contra el virus de EEV usando otras metodologías como las técnicas recombinantes 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).

I. 6.- EEV, respuesta inmunitaria y mediadores oxidativos

En la infección por EEV, se ha descrito que se produce la elevación de ciertos mediadores inmunitarios como la Interleucina 1 β (IL-1 β), que se ha caracterizado por ser una citocina proinflamatoria que participa como mediador en una gran cantidad de procesos implicados en un amplio espectro de patologías del SNC (Blamire et al., 2000). La IL-1 es segregada de forma inducible por múltiples tipos celulares, monocitos, macrófagos, células dendríticas, endoteliales, NK y gliales. Los monocitos/macrófagos secretan IL-1 en respuesta a productos bacterianos y citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IFN- γ) (Weawe et al., 1986). Existen dos formas, IL-1 α e IL-1 β , que actúan a través de receptores con actividades biológicas similares, IL-1RI e IL-1RII. Éstos pertenecen a la familia de los receptores tipo Toll/IL-1R (TLR) implicados directamente en la respuesta inmunitaria innata mediante el reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos como bacterias, hongos y virus (Martin et al., 2002).

Esta citoquina induce la liberación de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación.

Es el principal pirógeno endógeno, induciendo fiebre a través de la producción de prostaglandinas. Promueve la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos y actúa sobre el sistema nervioso central induciendo sueño y anorexia, típicamente asociados con los procesos infecciosos (Joost et al., 2000; Abbas et al., 2009). 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).

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 et al., 2006).

La respuesta inmunitaria adaptativa depende de la generación de diversas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores (TH por sus siglas en inglés, H= helper) y la consecuente producción y secreción de citocinas. Los linfocitos TH en estado no diferenciado, conocidos como linfocitos TH0, requieren que células profesionales presentadoras de antígeno (células dendríticas) le “presenten” antígeno 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 IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que son las responsables de colaborar en la respuesta inmunitaria humoral (Montaño et al., 2008). Debido a esto, 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 et al., 2004).

La neuroinvasión del virus produce lesiones a nivel celular, entre otros, originada por la acción de los productos del metabolismo del proceso de oxidación, como los radicales libres (Schoneboom et al., 1999), los cuales son necesarios para la formación de compuestos de alta energía utilizados para los procesos metabólicos celulares. De esta manera involucrándose la transferencia de electrones que pueden generar radicales libres o especies de oxígeno reactivas (ROS) como el anión superóxido (O_2^-), el anión hidroxilo (OH^-) y también el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Skaper et al., 1999). Estos radicales libres en conjunto (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).

Los radicales libres se generan en el metabolismo normal de la célula, en las reacciones de óxido-reducción, o a partir de procesos como la hipoxia, que puede causar lipoperoxidación en las membranas celulares. Las reacciones que estos radicales causan están asociadas con daños a lípidos de las membranas celulares, proteínas, carbohidratos y ADN (Halliwell y Gutteridge, 1999; Bendich, 1993). Los antioxidantes no enzimáticos se unen a los radicales libres y los transfieren del sitio donde pueden provocar daños, como de la membrana hacia el citoplasma, o los transforman en radicales menos agresivos. Ejemplos de este tipo de antioxidantes son la Coenzima Q (CoQ), el α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenos y ácido lipoico, entre otros (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Ahora bien, muchas sustancias involucradas directa o indirectamente en el daño tisular son liberadas al medio extracelular y pueden ser medidas en el suero; una es el Malondialdehído (MDA), producto directo de la acción de los radicales libres sobre los ácidos grasos polinsaturados de la membrana celular y producto final de la peroxidación lipídica la cual puede servir como marcador de estrés oxidativo y de la injuria tisular mediada por radicales libres de oxígeno (Fukunaga, 1995); por lo tanto, durante la invasión viral se evidencia una elevada concentración del MDA; de manera que se puede utilizar como un indicador de dicho estrés y de

la acción patógena del virus (Lepage et al., 1991). 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 (GSH), peroxidasa (GPx), la GSH 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, la disminución de antioxidantes en suero (Romero et al., 1998; Sonnerborg et al., 1988). La existencia de una correlación negativa entre los niveles séricos de MDA de estos pacientes y el conteo de linfocitos CD4+ confirman el involucramiento del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta infección (Romero et al., 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que el MDA en sobrenadantes de células de neuroblastoma múrido (Na₂) infectadas con EEV, tiene un marcado y significativo aumento de su producción a las 24 horas post-infección (Valero et al., 2008). Además, 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 podrían contribuir a la neurodegeneración luego de la infección por EEV (Schoneboom et al., 2000). En cultivos de astrocitos infectados con el virus de la EEV, 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).

El NO, es otra sustancia medible, y es producto de la acción de las isoenzimas de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) sobre la L-arginina, la cual es inducida por la liberación endógena de citocinas proinflamatorias y endotoxinas que producen grandes concentraciones de NO que son citotóxicas. 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), además, es altamente inestable, con una vida media de 6 segundos, que se degrada rápidamente a nitratos y nitritos (Stuehr et al., 1985). A su vez, el NO ha emergido como dispositivo fundamental en la señalización de la función celular crítica, así como un mediador potente del daño celular en una amplia gama de condiciones. La evidencia reciente indica que la mayor parte de la citotoxicidad atribuida a NO es algo debida al peroxinitrito, producido de la reacción difusión-controlada entre NO y el O_2^- , otro radical libre (Marín, 2000).

Han sido identificadas tres isoformas de NOS: neuronal o tipo I, iNOS o tipo II y NOS endotelial (eNOS) o tipo III. La 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 citoquinas proinflamatorias.

Una vez expresada, la iNOS sintetiza grandes cantidades de NO durante largos periodos de tiempo, independientemente de estímulos hemodinámicos o mecánicos (Sessa, 1994). En contraste, la 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 epitelio respiratorio.

Así mismo, 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). Es formado durante la conversión de L-arginina a L-citrulina, reacción catalizada por la NOS asociada a la vasculatura cerebral del SNC. También puede ser producido por un grupo de compuestos conocidos como donadores de NO como el Nitropusiato de Sodio (SNP) (Lahiri et al., 1999). El NO es producido 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. Sus formas inducibles pueden ser expresadas en muchos tipos de células incluyendo macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, células mesangiales y condrocitos (Gilad et al., 1998). 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 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 por la iNOS sugieren que esta molécula es un factor patogénico en esta infección (Fujii et al., 1999). Además, el NO se conoce por ser un radical libre gaseoso que media algunas funciones biológicas vitales, incluyendo la defensa del huésped, habiéndose descrito previamente entre sus múltiples propiedades efecto antiviral (Croen, 1993), así como intervenir en el balance oxidación/antioxidación en células de la inmunidad (Valero et al., 2002).

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 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.

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 podrían contribuir a la neurodegeneración luego de la infección por EEV (Schoneboom et al., 2000), sin embargo; otros estudios indican que el NO estimula la expresión de CD11b (Roy et al., 2006), las ROS son fundamental en la regulación de la expresión de CD11b en la microglía; diferentes estímulos patógenos tales como LPS, IL-1 β , β -amiloide fibrilar, el VIH-1 gp120, aumentan la expresión de CD11b por ROS (Avik et al., 2008).

I. 7.- Antioxidantes

Es importante señalar que las células tienen un grupo de mecanismos que las protegen contra el daño que ocurre por la continua generación de radicales libres de oxígeno; a ese grupo de mecanismos se le denomina “Sistema Antioxidante” e incluye enzimas y compuestos antioxidantes, la compartimentalización celular y los mecanismos de reparación (Gutiérrez, 2002). Por ello, el componente antioxidante del organismo humano tiene elementos exógenos y endógenos. Entre los primeros están las vitaminas antioxidantes esenciales (A, C, E) y microelementos, en los que figuran metales como el hierro (Fe) y el selenio (Se) (Houston, 2005). Sin embargo, el mecanismo molecular de acción de la vitamina C la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido, o de nitrosaminas durante la

digestión (Epperly et al., 2004); además, es el agente que reduce los radicales fenoxilo formados durante la actividad vitamínica E, restableciéndola (Chao et al., 2002).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN (Thomas, 1994).

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las ROS que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente, ya sea, membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante se debe a su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN), funcionalmente vitales o más importantes (Reitter, 1995). Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidro-fóbicos (Jakoky, 1990). Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los

nutrientes que los contienen (Venereo, 2002). Sin embargo, el papel de las enzimas antioxidantes en la infección por virus dengue no ha sido completamente dilucidado.

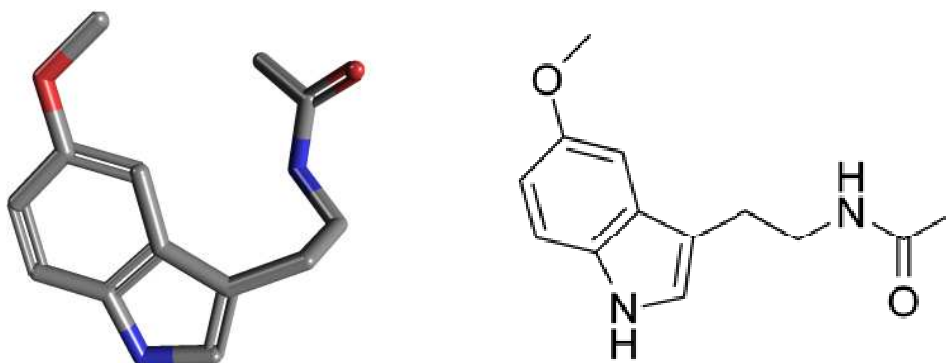
I. 7.1.- Melatonina

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, 2005). Adicionalmente, se ha reportado que las hormonas neuroendocrinas regulan diversos efectos sobre las células inmunitarias (Finochiaro et al., 1991).

Entre las neurohormonas y neuropéptidos que influyen 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 et al., 2009). Sin embargo, se ha encontrado en otra variedad de tejidos como en glándulas lagrimales extra orbitales (M.H. Jang et al, 2007), porciones del tracto gastrointestinal y ciertas células sanguíneas (Finochiaro et al., 1988,1991). Participa en diversos procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos. Es sintetizada durante la noche 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, 2007; Zhou et al., 2008). Además, la

MLT limita la peroxidación lipídica inducida por NO, inhibe la NOS cerebral, captura peroxinitritos y altera la actividad de enzimas que aumentan la capacidad antioxidativa del organismo (Arias et al., 2003).

I. 7.1.1.- Estructura



Melatonina: N-acetil-5-metoxitriptamina. Fórmula empírica: C₁₃H₁₆N₂O₂. Peso molecular: 232.28. Biodisponibilidad: 30 - 50% (Zhou et al., 2008).

Es un antioxidante de gran potencia, que se ha demostrado previamente protege contra daños cerebrales isquémico en ratas y ratones (Ertugrul et al., 2004). 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 NOS 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). Por ser la MLT un componente altamente lipofílico, puede penetrar sin mediación de receptores específicos y actuar dentro de la células como un potente capturador de radicales libres y como un factor antienvjecimiento (Maestroni et al., 1990, 1988).

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 función principal de la MLT es la de sincronizar la actividad biológica del medio interno con el fotoperíodo, de manera que esta hormona conduce la influencia del ciclo luz-oscuridad sobre la fisiología del organismo, interviniendo en la regulación de los sistemas neuroendocrino e inmunitario (Caroleo et al., 1992).

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 MHC clase II y el TNF- α (Pioli et al., 1993).

La MLT inhibe la proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos (Finnochiaro 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; Atre et al., 1998), algunas drogas (Caroleo et al., 1992; Maestroni, 1988,1999; 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; 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 et al., 2009).

Por otra parte, 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.

Así mismo, 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 NOS 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.

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.

Aunado a esto, se ha comprobado que la MLT tiene un efecto sobre la producción de NO, MDA e IL-1 β en modelos experimentales de infección por EEV *in vivo* e *in vitro*, confirmando su actividad de eliminar radicales libres e indirectamente de antioxidante (Bonilla et al., 1997; Valero et al., 2006; Espina et al., 2003). Estos hallazgos sugieren que el virus de EEV es capaz de aumentar el

metabolismo oxidativo nitrogenado en el cerebro durante la infección y que la MLT puede contrarrestar este efecto. El aumento del NO pudo haber inducido daño cerebral como lo revela el aumento de los niveles de peroxidación lipídica en los animales infectados por el virus al quinto día de estudio, que de igual manera fueron significativamente disminuidos por el tratamiento con MLT (Valero et al., 2006).

En referencia al efecto protector de la MLT en ratones infectados por el virus de EEV, tal como lo describen **Bonilla et al., (1997)**, quienes reportaron un aumento de la tasa de supervivencia en ratones infectados con este virus y tratados con MLT; y en ensayos *in vitro*, obtuvieron una disminución del efecto citopático en cultivos celulares susceptibles a la infección. Por su parte, en una línea celular derivada del hipocampo mûrido (HN2-5) se investigó el efecto neuroprotector de dos antioxidantes: N-acetilcisteína (NAC) y la MLT, los resultados demostraron que el NAC y la MLT impiden el aumento de la apoptosis en neuronas tratadas con etanol; por lo que ambos antioxidantes elevan significativamente la expresión de genes anti-apoptóticos (Sheth et al., 2009).

I. 7.1.2.- MLT, 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-benzilriptamina), 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 ML., 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 et al., 2001; Witt-Enderby, 2001; 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).

I. 7.2.- Minociclina

Las tetraciclinas constituyen una familia de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y declomicina) y semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp., que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas (Pérez et al., 2003). El género pertenece al grupo de bacterias actinomicetales (Sumano y Ocampo 1997). Son agentes básicamente bacteriostáticos, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos, por lo

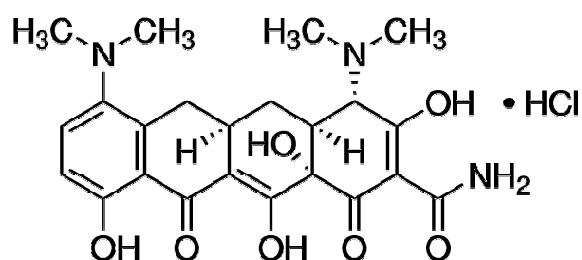
que se han convertido en antibióticos de uso habitual en seres humanos, en animales y en algunas áreas de la agricultura (Klein et al., 1995).

Son compuestos derivados del anillo policíclico naftacenocarboxamida. Todas las tetraciclinas poseen un núcleo de estructura tetracíclica lineal compuesta de cuatro anillos fusionados (Pérez et al., 2003). Además, son polvos alcalinos ligeramente amarillos sin olor y levemente amargos, que se destruyen con soluciones alcalinas fuertes y soluciones ácidas con pH inferior a 2. Es importante señalar que *in vitro* las tres tetraciclinas de corta duración (oxitetraciclina, clortetraciclina, y tetraciclina) tienen una eficacia comparable, *in vivo* su utilidad clínica dependerá de su capacidad para llegar a los tejidos afectados. En este sentido, la oxitetraciclina y la tetraciclina son más biodisponibles que la clortetraciclina y, por lo tanto, más eficaces. Así, la biodisponibilidad de la doxiciclina y la minociclina es superior a la de las anteriores, lo que concuerda con su mayor liposolubilidad (Sumano y Ocampo 1997).

La Minociclina (MIN), es una tetraciclina semisintética de segunda generación de probada eficacia, capaz de atravesar la BHE. Estudios previos han demostrado que este antibiótico es capaz de inducir la reducción del infarto y la supervivencia creciente de las neuronas del hipocampo después de la isquemia focal o global, respectivamente, efectos que son acompañados por una reducción en la expresión de la enzima convertidora de IL-1 β (caspasa 1), ciclooxigenasa-2, y RNAm de la iNOS en regiones afectadas del cerebro (Yansheng et al., 2001).

Se caracteriza por presentar una excelente biodisponibilidad por vía oral, con una semivida de 11-22 horas, lo que hace que alcance valores de concentración plasmática 12 veces superiores a los demás compuestos de su grupo. Su pequeño tamaño, le confiere una elevada difusión a través de membranas fosfolípicas, incluida la barrera hematoencefálica, que le permite alcanzar concentraciones clínicamente efectivas en el SNC (Macdonald et al., 2003).

I. 7.2.1.- Estructura



Minociclina: 2-(amino-hidroxi-metilideno)-4,7-bis(dimetilamino)-10,11,12a-trihidroxi-4a,5,5a,6-tetrahidro-4H-tetraceno-1,3,12-triona (sinónimo:7-dimetilamino-6-demetil-6-deoxitetraciclina). Fórmula empírica: $C_{23}H_{27}N_3O_7 \cdot HCl$. Peso molecular: 493,94 Biodisponibilidad: 95% (R.M. Melero et al., 2008).

I. 7.2.2.- Propiedades de la MIN

Independientemente de su función antimicrobiana, presenta propiedades antiinflamatorias demostradas en la artritis reumatoide y analgésicas en el dolor neuropático. Aunque todavía no se ha aprobado esta indicación terapéutica, en la

última década se han realizado estudios que han puesto de manifiesto que la minociclina puede conferir citoprotección en los sistemas cardiovascular, renal y nervioso (Yrjanheikki et al., 2008; Wu et al., 2002). Este hecho suscita una gran controversia en el campo de la farmacología, ya que con frecuencia se encuentran estudios que presentan resultados contradictorios en situaciones similares, incluso la ausencia de efecto o, en el peor de los casos, la exacerbación de la toxicidad (Fernández-Gómez et al., 2005; Yang et al., 2003).

La acción antimicrobiana de la MIN se debe a su unión con la subunidad ribosomal 30S, que da lugar a la inhibición de la interacción entre el ARN mensajero y el transferente, y al consiguiente bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual puede ejercer un efecto neuroprotector (Chambers et al., 2001).

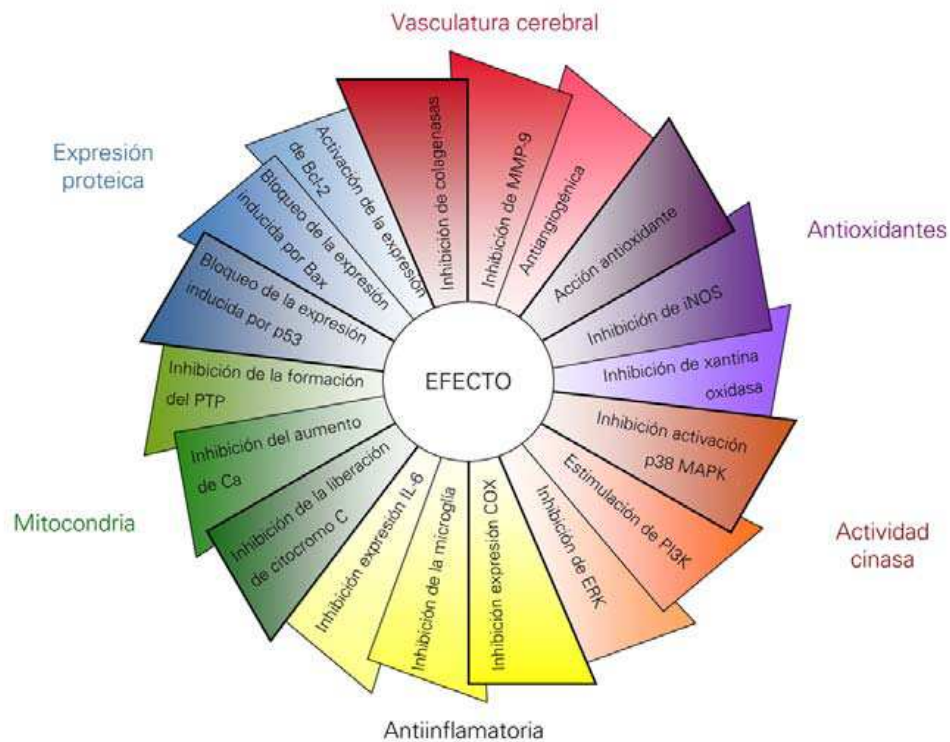


Figura 3. Posibles dianas farmacológicas de la MIN. (R.M. Melero et al., 2008).

Diversos estudios han demostrado que la neurotoxicidad de las toxinas microgliales es mediada a través del receptor para la enzima N-metil-D-aspartato (NMDA), donde la MIN representa un potencial agente terapéutico para las enfermedades cerebrales al inhibir la NMDA inducida por la activación de p38; mitógeno que activa proteínas quinasas (MAPK) en células microgliales (Tiina y Koistinaho, 2001). Así mismo, la MIN inhibe la apoptosis inducida por el virus West Nile en células neuronales de cerebro humano, reprimiendo la activación de la JNK por lo que reduce significativamente los títulos virales (Michaelis et al., 2007).

También, se ha demostrado su importante papel neuroprotector en la patogenia de animales transgénicos que poseen el gen de la enfermedad de Huntington's, y en las patologías neurodegenerativas progresivas como la enfermedad de Parkinson (Chen et al., 2000; Blum et al., 2004).

Por otra parte, la MIN ejerce efectos antiinflamatorios que son totalmente separados y distintos de su acción antimicrobiana (Yansheng et al., 2001). Se ha reportado la MIN tienen un número de acciones biológicas y farmacológicas, incluyendo la capacidad de inhibir metaloproteasas de la matriz, la producción del superóxido de los neutrófilos, y la expresión de la iNOS en cartílago humano y macrófagos (Golub et al., 1998; Golub et al., 1999). En diferentes enfermedades neurodegenerativas se ha descrito un desequilibrio entre agentes pro-oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros (Estévez y Jordán, 2002).

Así mismo, la MIN ha mostrado en diversos modelos una capacidad antioxidante directa o indirecta (Kraus et al., 2005). Además, este fármaco inhibe la actividad de complejos enzimáticos generadores de ROS como xantina-xantina oxidasa y NADPH oxidasa (Choi et al., 2005). Por otro lado, la MIN presenta un efecto antioxidante indirecto al ser capaz de inhibir el nivel de expresión de las enzimas generadoras de ROS como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la iNOS (Chao y Allen, 1992., Chabot et al., 2002).

En roedores, la MIN cruza fácilmente la BHE con un índice por lo menos de por cinco veces más arriba que la doxiciclina (Colovic et al., 2003; Smith et al., 2003). Casi todos los efectos beneficiosos de la MIN se relacionan con una actividad inhibitoria en la inflamación y/o la muerte apoptótica celular, ambos fenómenos son relacionados con la degeneración neuronal. Varios estudios indican claramente que la MIN puede inhibir la inflamación y más particularmente la microgliosis. Morfológicamente, la MIN reduce la proliferación/activación de las células de la microglia (Dommergues et al., 2003). Independientemente, la MIN puede modular la muerte neuronal de la célula a través de una interacción con la maquinaria apoptótica. Así, la MIN actúa a nivel mitocondrial para impedir un colapso potencial de las transmembranas y las alteraciones de permeabilidad, los cuales son responsables de la liberación citosólica de factores apoptogénicos tales como citocromo C (Zhu et al., 2002).

Se ha comprobado que el pretratamiento con MIN inhibe significativamente la muerte celular neuronal usando co-cultivos de neuroglia tratados con LPS. Los LPS inducen la expresión de iNOS significativamente, produciendo el NO dentro de las células gliales, la MIN inhibió la expresión de iNOS y NO y aumentó la supervivencia neuronal en los co-cultivos de neuroglia. Además, el pretratamiento con MIN inhibe significativamente la producción de TNF- α por medio de LPS en las células del gliales (Sang M et al., 2004).

I. 7.3.- Ácido Ascórbico

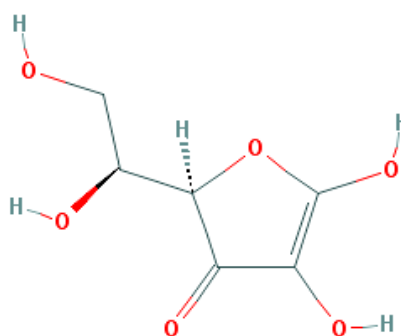
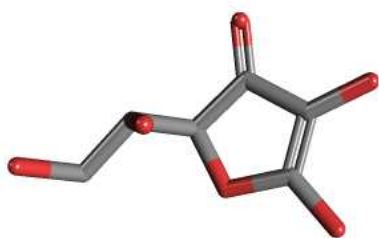
El ácido ascórbico (AA), en contraste con la vitamina E, es hidrofílico y funciona mejor en los ambientes acuosos celulares, como barredor de radicales libres, puede actuar directamente con el O_2^- y el radical hidroxilo, así como con varios hidroperóxidos lipídicos. Con la adición de suplemento de AA se puede prevenir la sobreproducción de iNOS (Wu et al., 2002). A su vez, la vitamina C mejora el daño oxidativo inducido por el imidacloprid (plaguicida) a través de la disminución de la peroxidación lipídica. El efecto protector del pretratamiento con la vitamina C contra el imidacloprid en el hígado de ratones es mejor que el post-tratamiento (El-Gendy et al., 2010).

Participa en la formación de ciertos neurotransmisores como la serotonina, en la conversión de dopamina a noradrenalina, y en otras reacciones de hidroxilación que incluyen a los aminoácidos aromáticos y a los corticoides. Su concentración disminuye bajo situaciones de estrés cuando hay mucha actividad de las hormonas de la corteza suprarrenal. La vitamina C cumple una función importante en el sistema inmunológico, al ayudarlo a luchar contra las infecciones y contra las células cancerosas, esto, gracias a la actividad de los leucocitos, la estimulación de anticuerpos, neutrófilos y fagocitos, la producción de interferón (P. M. de Portela, 1994).

I. 7.3.1.- Características y su función antioxidante

La vitamina C corresponde al grupo de las vitaminas hidrosolubles, y como la gran mayoría de ellas no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través de la orina. Por este motivo, es importante su administración diaria, ya que es más fácil que se agoten sus reservas que las de otras vitaminas. Es una sustancia de color blanco, inodoro, estable en su forma seca, pero en solución se oxida con facilidad, más aún si se expone al calor. Un pH alcalino (mayor a 7), el cobre y el hierro, también aceleran su oxidación. Su estructura química recuerda a la de la glucosa (en muchos mamíferos y plantas, esta vitamina se sintetiza a partir de la glucosa y galactosa) (P. M. de Portela, 1994).

I. 7.3.2.- Estructura



Ácido ascórbico: (R)-3,4-dihidroxi-5-((S)-1,2-dihidroxietyl) furano-2(5H)-ona. Fórmula empírica: C₆H₈O₆. Peso molecular: 176,12 (Fain, 2004).

Al tener gran capacidad de captar y liberar hidrógeno (oxido-reducción), su papel en el metabolismo es de gran importancia. Es importante su función como

reductora del Fe^{+3} a Fe^{+2} lo que asegura una mayor absorción a nivel del intestino. Facilita a la vez la liberación del hierro de la transferrina (proteína que transporta el hierro en sangre) y también de la ferritina (una de las principales formas de almacenamiento del hierro). Es importante su participación en la formación del colágeno y mucopolisacáridos, ya que es necesaria junto con el O_2 y el Fe^{+2} para formar hidroxiprolina e hidroxilisina (componentes del colágeno) El colágeno es una sustancia de la cual depende la integridad de todos los tejidos fibrosos, como son la piel, el tejido conjuntivo, la dentina, matriz ósea, cartílago y los tendones; en la formación de esta proteína radica su importancia como cicatrizante de heridas y fracturas. Su concentración disminuye bajo situaciones de estrés cuando hay mucha actividad de las hormonas de la corteza suprarrenal (Murray, 1993; P. M. de Portela, 1994).

Por otra parte, se ha demostrado que el pretratamiento de células humanas de Glioblastoma T98G y células U87MG con AA atenúa la producción de ROS, la fosforilación de p38 MAPK y la activación de JNK1 y por ende reduce significativamente la muerte celular (Arabinda et al., 2007).

Huang J et al., (2006) en su trabajo sugieren que el beta-Amiloide causa apoptosis y muerte en las neuronas cultivadas, estos autores demostraron que el AA puede proteger las células cultivadas del neuroblastoma SH-SY5Y contra la muerte apoptótica de la célula. Dado que el beta-amiloide induce apoptosis y muerte en las neuronas sugirieron que el AA intracelular debido a su efecto antioxidante previene

con eficacia esta toxicidad. Los daños neuronales que siguen de una lesión hipóxico-isquémica del cerebro (HI) son causados en parte por la producción de los radicales libres y de las ROS. El AA es un antioxidante potente, que neutraliza varios tipos de ROS. Estos estudios han demostrado que el AA es neuroprotector, sin embargo, esta afirmación sigue siendo polémica (Miura et al., 2006).

El presente estudio es de vital importancia dado que el virus de la EEV; así como las ROS ocasionan graves daños neurodegenerativos trayendo como consecuencia enfermedades como Alzheimer, Parkinson, entre otras, en donde el daño oxidativo es en parte causa del trastorno. El efecto neuroprotector de los antioxidantes fueron analizados *in vitro* por medio de los cultivos celulares de neuroblastoma mûrido (Na₂) puesto que las células tumorales tienen una alta capacidad de reproducción, por lo que son fácilmente cultivables y permanecen durante un tiempo indefinido en cultivo, de esta forma el virus puede comportarse como lo haría en el organismo del individuo, lo que permitirá observar los efectos citopáticos que pudieran producirse (Valero et al., 2006), mientras que los estudios en el modelo experimental murino *in vivo* se realizó a través del suero y homogeneizados de cerebro infectados con el virus de EEV.

Se justifica en esta investigación el estudio e implementación de nuevos métodos de prevención y/o tratamiento terapéutico de la infección producida por el virus de EEV. En este sentido, la búsqueda de algún fármaco que pueda ser capaz de prevenir o inhibir las alteraciones producidas por el virus de la EEV, tanto en

humanos como en animales y en sistemas *in vitro* e *in vivo*, y estudiar de esta manera que fármaco o tratamiento pudiera ser el más eficaz contra alguna enfermedad o patología, en este caso la EEV.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La Encefalitis Equina Venezolana (EEV) es una infección de gran relevancia clínica y económica en el área geográfica del norte de Suramérica. El cuadro viral endémico en sus ciclos de exacerbación epidémicos ha afectado a decenas de miles de personas en Venezuela con marcada morbimortalidad en humanos y équidos. Es causada por un virus del género *Alfavirus* que sólo se encuentra en la región de las Américas. 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. En el sistema productivo la EEV ha generado cuantiosos daños económicos por la inducción de muerte o sacrificio de cientos de animales de la cabaña equina. La infección por el virus de EEV genera una respuesta inflamatoria sistémica y por su tropismo al SNC puede ocasionar secuelas y daños muchas veces irreversibles.

Los mecanismos patogénicos se han asociado con su acción citopática directa sobre las células del SNC e indirecto a través de la inducción de una respuesta inmunitaria inflamatoria. A su vez, la adecuada funcionalidad del sistema inmunitario es capaz de prevenir la progresión de la infección y proteger de la lesión neurológica. En los individuos que sobreviven la respuesta inmunitaria controla la infección por inducción de un daño inflamatorio de intensidad variable.

En función de la actividad inmunomoduladora y antioxidante que ha demostrado la MLT, y a su vez, el AA y la actividad terapéutica de antibióticos como la MIN, en los diferentes estudios previos realizados, y debido a la relevancia que el

sistema inmunitario tiene en la patogénesis de la infección por el virus de EEV, es posible que estas moléculas que modulan su actividad reguladora y/o efectora pudieran poseer acciones terapéuticas. La 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 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 del sistema inmunitario.

El uso de los antioxidantes *in vitro* en cultivos celulares de Na₂ infectadas por el virus de EEV, influirá significativamente disminuyendo la producción de NO y MDA, debido al efecto antioxidante que conduce a la captura de estos radicales libres originados a consecuencia de la infección viral y consecuentemente la peroxidación lipídica de las membranas celulares. Por otra parte, *in vivo* la administración aislada o combinada de antioxidantes como MLT, MIN y AA pudieran mostrar una acción capturadora de radicales libres y especies reactivas de nitrógeno disminuyendo la producción de NO y MDA. En base a estos antecedentes, se plantea investigar el posible efecto terapéutico preventivo de la MLT, MIN y AA *in vitro* e *in vivo* sobre la producción de NO, MDA y la replicación viral en modelos experimentales de infección por el virus de EEV.

Objetivo general

- 1) Determinación del efecto *in vitro* e *in vivo* de la MLT, MIN y AA sobre la replicación viral, producción de NO y MDA en cultivos celulares y ratones infectados por el virus de EEV.

Objetivos específicos

- 1) Titulación de los niveles del virus en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na₂) y en homogeneizados de cerebro de ratones infectados tratados y no tratados con la MLT, MIN y AA.
- 2) Análisis de la actividad de la MLT, MIN y AA sobre la producción de NO y MDA, en cultivos de células Na₂ infectados por el virus de EEV, suero y homogeneizados de cerebro de ratones.
- 3) Determinación del efecto sinérgico o antagónico de estos fármacos ante la infección por EEV en los modelos experimentales de esta infección viral.
- 4) Establecimiento de un posible mecanismo de acción terapéutico preventivo de estos fármacos en la infección con el virus de EEV.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1.- Virus

Se utilizó la cepa Guajira (E-100) del virus de EEV, mantenida en pasajes sucesivos en cerebro de ratones lactantes, en la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”. 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 placas 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 (Espina, 2005).

El stock de virus de 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 50 μ l 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).

III. 2.- Melatonina

Se empleó Melatonina (Research Biochemical Internacional, MA, U.S.A) altamente purificada, diluida en PBS estéril. Para los ensayos *in vitro* con monocapas confluentes de células Na₂, se utilizaron dosis de MLT de 0,5 mM, 1,0 mM y 5,0 mM, 30 minutos antes de la infección. A las células control no se les colocó virus ni MLT y fueron sometidas a las mismas condiciones del ensayo (Noda et al., 1999 y Valero et al., 2006).

La MLT se utilizó a una concentración de 500 µg por kilogramo de peso (µg/Kg) para el tratamiento *in vivo* de los animales, inoculada por vía subcutánea (s.c) en un volumen de 50 µl/dosis, como dosis individual y para las combinaciones con los otros antioxidantes, según el esquema de tratamiento preventivo, 3 días antes de la inoculación del virus (Bonilla et al., 1997) y dos horas antes de oscurecer (entre 5:00 y 6:00 pm) (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).

III. 3.- Minociclina

En los ensayos *in vitro* con células Na₂, se utilizó Minociclina (SIGMA, U.S.A) altamente purificada diluida en PBS estéril, en dosis de 0,1 µM, 0,2 µM y 2,0 µM según el tratamiento preventivo 30 minutos antes de la infección (Tiina y Koistinaho, 2001). Para los experimentos *in vivo* la MIN se utilizó a una concentración de 50 mg por kilogramo de peso (mg/Kg) a dosis de 50 µl por vía s.c, como dosis individual y para las combinaciones con los otros antioxidantes 3 días antes de la inoculación viral (Sarah M, 2008).

III. 4.- Ácido ascórbico

Se empleó Ácido ascórbico (SIGMA, U.S.A) purificado y diluido en PBS estéril *in vitro* en las células Na₂, a dosis de 25,0 µM, 50,0 µM y 75,0 µM 1 hora antes de la infección viral (Arabinda et al., 2007). Para el tratamiento *in vivo* se utilizó una concentración de 50 mg/Kg por vía s.c en un volumen de 50 µl/dosis, previo tratamiento de 3 días antes de la inoculación del virus (Madhusudana et al., 2004).

III. 5.- Sistema *in vitro*

III. 5.1.- Cultivo de células de neuroblastoma múrido (Na₂)

Se utilizaron células de Na₂ obtenidas 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 placas de cultivo de 24 pozos a razón de 300 µl/pozo estimando una población celular de 3×10^5 células/pozo, con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) (SIGMA-ALDRICH® St. Louis, USA) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino, 1% de antibiótico-antimicótico y en atmósfera de 5% de CO₂ (Espina, 2005). En cada uno de los pozos que contenían las monocapas formadas de células Na₂, se colocó el virus de la EEV y las concentraciones previstas de MLT, MIN y AA según el esquema de trabajo establecido. A las células control no se les colocó virus ni los antioxidantes y fueron sometidas a las mismas condiciones del ensayo.

En cada uno de los pozos que contenían las monocapas formadas de células Na₂ se colocó el virus de EEV, MLT, MIN y AA por triplicado a las concentraciones previstas, según el esquema de trabajo establecido para un total de cinco ensayos.

Grupos de trabajo

GRUPO A (Controles)	GRUPO B (Tratamiento individual + EEV)	GRUPO C (Tratamiento combinado + EEV)
Control celular (-) sin fármacos o virus	EEV + MLT	MLT+ MIN + EEV
Melatonina (MLT)	EEV + MIN	MLT+ AA+ EEV
Minociclina (MIN)	EEV + AA	MIN+ AA+ EEV
Ácido ascórbico (AA)		
Control (+) EEV		

III. 5.2.- Recolección de muestras

Para los ensayos *in vitro* se tomaron sobrenadantes de los cultivos de células Na₂ (triplicado) para las determinaciones de títulos virales, concentraciones de NO, MDA, proteínas e Inmunofluorescencia indirecta a las 24 h p.i. (Espina, 2005).

III. 6.- Determinación del título viral

Los títulos de infectividad viral tanto en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrdo como en cerebro se determinaron por la Técnica de Plaqueo de Bergold y Mazzali (Bergold & Mazzali, 1968) en monocapas confluentes de células VERO (Células de riñon de mono verde africano), crecidas en placas de cultivos de 24 pozos, a una concentración de 1×10^{-6} cel/ml, en medio de crecimiento [Eagle's MEM con 10% de suero fetal bovino, estreptomycin (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml) y anfotericina B (2.5 µg/ml)]. Diluciones seriadas del virus y de las muestras fueron inoculadas en monocapas confluentes y se colocó una sobrecapa de agar (Overlay). Después de 1 hora de adsorción a 37°C, se lavaron las monocapas y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, por 48 horas aproximadamente (o hasta que el efecto citopático del virus fue evidente). Se contaron las placas después de la coloración con cristal violeta al 0,2%.

III. 7.- Cuantificación de NO

La determinación de NO en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido, suero y homogeneizados cerebrales se realizó mediante un ensayo de diazotización, basado en la Reacción de Griess, para ello se utilizó el kit de análisis de Oxido nítrico Quantichrom™ de la casa comercial Bioassay Systems (Hayward, USA). La prueba se basa en la Reacción de Griess. Se fundamenta en que la adición de nitritos y ácido sulfanílico interactúa con N-(1-naftil)-etilendiamina, generando un producto que es fácilmente monitoreado por espectrofotometría a 550 nm. Los valores fueron expresados en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína en cultivos y homogeneizados cerebrales mientras que en los sueros $\mu\text{M}/\text{ml}$.

III. 8.- Determinación de MDA

El contenido de MDA (un producto de la hidrólisis de hidroperóxidos de lípidos), en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido, suero y homogeneizados cerebrales fue determinado a través del ensayo con ácido tiobarbitúrico (NWLSS™ Malondialdehyde Assay, Vancouver, WA). Este método 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 (15:1) 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, la cual es medida contra un blanco reactivo a 532 nm. Se utilizó como estándar externo el MDA bis-dimetil acetato y los resultados se expresaron como $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína en cultivos y homogeneizados cerebrales y $\mu\text{M}/\text{ml}$ en los sueros.

III. 9.- Determinación de proteínas

Se cuantificaron las proteínas en sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma mürido y en los homogeneizados cerebrales a través del Método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), basado en la unión del colorante Comassie blue G-250 a las proteínas. El cálculo de la concentración se determinó a través de una curva de regresión lineal de densidad óptica vs. concentración que se obtuvo con estándares de concentraciones conocidas de albúmina y que se incluyeron simultáneo al procesamiento de las muestras. Los resultados se leyeron a 595 nm y fueron expresados en mg.

III. 10.- Infectividad viral por Inmunofluorescencia indirecta

En las células se identificaron los antígenos del virus de EEV a través de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) por el Método descrito por Tesh (1979) con anticuerpos monoclonales específicos producidos en ratón y un anticuerpo secundario conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (anti-mouse IgG FITC, Sigma, St. Louis MO). Se utilizó para la visualización un microscopio invertido con fluorescencia modelo 872E (Carl Zeiss).

III. 11.- Sistema *in vivo*

III. 11.1.- 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 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) infectados con el virus de EEV, c) tratados con 500 µg de MLT/Kg de peso corporal, d) tratados con 50 mg de MIN/Kg, e) tratados con 50 mg de AA/Kg de peso corporal, f) infectados y tratados con 500 µg de MLT/Kg, g) infectados y tratados con 50 mg de MIN/Kg de peso corporal, h) infectados y tratados con 50 mg de AA/Kg, i) tratados con 500 µg de MLT/Kg y 50 mg de MIN/Kg de peso corporal, j) tratados con 50 mg de MIN/Kg y 50 mg de AA/Kg, k) infectados y tratados con 500 µg de MLT/Kg y 50 mg de MIN/Kg de peso corporal e l) infectados y tratados con 50 mg de MIN/Kg y 50 mg de AA/Kg.

III. 11.2.- Ensayos *in vivo*

Los animales se inyectaron por vía s.c comenzando 3 días antes de la inoculación viral, distribuidos de la siguiente manera:

Ensayo <i>in vivo</i>
Grupo Control (PBS)
Grupo infectado (10 DL₅₀ del virus) no tratado (EEV)
Grupo no infectado tratado con 500 µg/Kg de Melatonina (MLT)
Grupo no infectado tratado con 50 mg/Kg de Minociclina (MIN)
Grupo no infectado tratado con 50 mg/Kg de Ácido ascórbico (AA)
Grupo infectado tratado con Melatonina (10 DL₅₀ + 500 µg/Kg de MLT) (EEV+MLT)
Grupo infectado tratado con Minociclina (10 DL₅₀ + 50 mg/Kg de MIN) (EEV+MIN)
Grupo infectado tratado con Ácido ascórbico (10 DL₅₀ + 50 mg/Kg de AA) (EEV+AA)
Grupo no infectado tratado con Melatonina y Minociclina (500 µg/Kg de MLT + 50 mg /Kg de MIN) (MLT+MIN)
Grupo no infectado tratado con Minociclina y Ácido ascórbico (50 mg/Kg de MIN + 50 mg/Kg de AA) (MIN+AA)
Grupo infectado tratado con Melatonina y Minociclina (10 DL₅₀ + 500 µg/Kg de MLT + 50 mg/Kg de MIN) (EEV+MIN+MLT)
Grupo infectado tratado con Minociclina y Ácido ascórbico (10 DL₅₀ + 50 mg/Kg de MIN + 50 mg/Kg de AA) (EEV+MIN+AA)

Volumen del inóculo: 50µl de cada antioxidante.

Para el ensayo de sobrevida se utilizaron ratones que tenían las mismas condiciones que las del ensayo *in vivo*. Aunado a esto la MLT, MIN y el AA del grupo de ratones que se utilizaron para la sobrevida, fue clasificado de la misma forma que en los ensayos *in vivo* según el esquema de tratamiento preventivo.

Las dosis que fueron utilizadas para los tratamientos están basadas en estudios previos (Bonilla et al., 1997, Sarah, 2008, Madhusudana et al., 2004).

III. 11.3.- Recolección de muestras

Al 1^{ero}, 3^{ero} y 5^{to} día post-infección (p.i.) se extrajo sangre completa por punción del seno orbital (ángulo interno del ojo) de los ratones (n=5/grupo) en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero, para la determinación de anticuerpos IgM anti EEV y concentración de NO y MDA. Posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para la obtención de sus cerebros, previa perfusión con solución salina al 0,9% por vía intracardiaca. A los mismos se les determinó el contenido de proteínas, cuantificación de NO y MDA y títulos virales. Cada cerebro se almacenó en recipientes estériles separados, a -70°C hasta su procesamiento. Para determinar el título viral, se prepararon suspensiones al 20% en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.0, de acuerdo al peso del mismo.

III. 12.- 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.

III. 13.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron representados como promedios \pm Desviación Estándar (DE) y la significación estadística entre dos medias se analizaron mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) entre los diferentes grupos de tratamiento con MLT, MIN y AA. El criterio para la significación estadística fue de $p < 0,05$. Para el cálculo de las concentraciones se utilizó el programa estadístico Instat y para la comparación entre el control con los resultados de diferentes tratamientos se realizó mediante el procesamiento de comparaciones múltiples de Bonferroni, utilizando el programa estadístico Graph Pad Prisma 5.0.

IV. RESULTADOS

IV. 1.- Estudios *in vitro*

IV. 1.1.- Efecto de los antioxidantes sobre la replicación viral en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na₂) infectados por el virus de EEV.

Al evaluar los resultados obtenidos del tratamiento individual con MLT, se observó en los cultivos celulares infectados (EEV: $6,23 \pm 2,51 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) que los valores en los títulos fueron significativamente incrementados ($p < 0,001$) al compararlos con el resto de los grupos (EEV+MLT 0,5 mM: $7,33 \pm 5,77 \times 10^2$ UFP/mg de proteína; EEV+MLT 1,0 mM: $9,33 \pm 5,77 \times 10^2$ UFP/mg de proteína y EEV+MLT 5,0 mM: $1,23 \pm 5,77 \times 10^3$ UFP/mg de proteína). En el grupo de EEV+MLT 0,5 mM también se encontró una disminución significativa ($p < 0,05$) en relación al grupo infectado y tratado con MLT 5,0 mM (EEV+MLT 5,0 mM) (Figura 1A).

Los títulos virales en los cultivos celulares infectados que no recibieron tratamiento con MIN (EEV: $6,23 \pm 2,51 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) presentaron aumento significativo con respecto al resto de los grupos pretratados con diferentes dosis de MIN (EEV+MIN 0,1 μ M: $2,05 \pm 1,8 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN 0,2 μ M: $2,75 \pm 2,55 \times 10^3$ UFP/mg de proteína y EEV+MIN 2,0 μ M: $2,71 \pm 1,04 \times 10^3$ UFP/mg de proteína). A su vez, el grupo infectado y tratado con MIN 0,1 μ M (EEV+MIN 0,1 μ M) obtuvo una titulación viral menor ($p < 0,05$) que la de los grupos infectados y tratados con MIN 0,2 μ M (EEV+MIN 0,2 μ M) y MIN 2,0 μ M (EEV+MIN 2,0 μ M), respectivamente (Figura 1B).

En los cultivos celulares infectados con el virus de EEV bajo tratamiento con AA, se evidenció un incremento significativo en los títulos virales del grupo infectado no tratado (EEV: $6,23 \pm 2,51 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) en comparación con el resto de los grupos estudiados (EEV+AA 25,0 μ M: $4,38 \pm 1,89 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+AA 50,0 μ M: $4,06 \pm 1,00 \times 10^3$ UFP/mg de proteína y EEV+AA 75,0 μ M: $4,42 \pm 1,75 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) (Figura 1C).

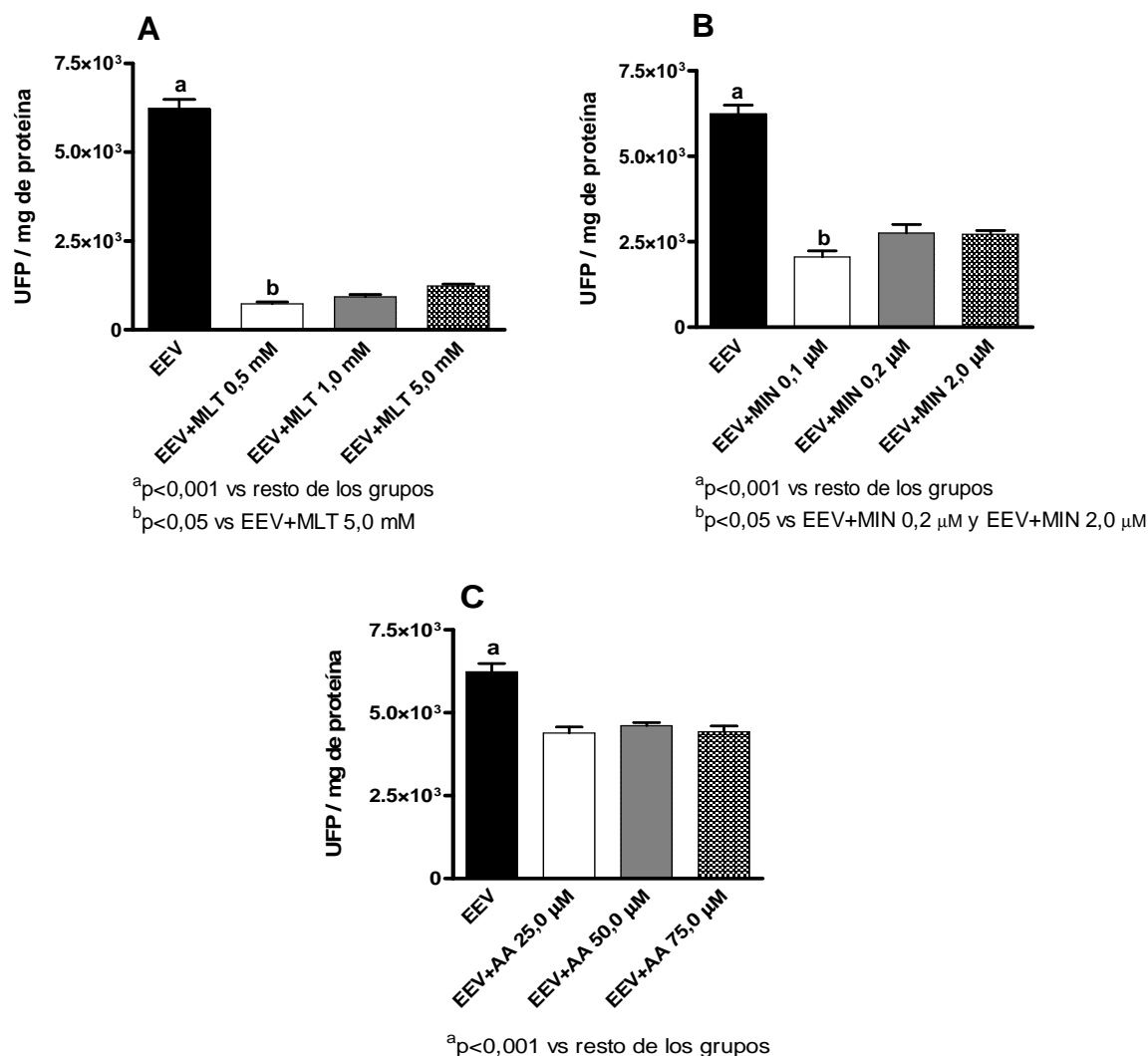


Figura 1. Titulación viral en cultivos celulares infectados por el virus de EEV bajo tratamiento individual con MLT (A), MIN (B) y AA (C). Los títulos de infectividad viral se determinaron por la técnica de plaqueo. Los datos representan $X \pm DE$ de cinco ensayos. La significancia estadística fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 1.2.- Análisis del efecto de MLT, MIN y AA sobre la producción de NO en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na₂) infectados por el virus de EEV utilizando diferentes dosis de tratamiento.

In vitro, a las 24 horas p.i. se observó que los valores de NO en células de neuroblastoma múrido infectadas con EEV y tratadas con la dosis de menor concentración de MLT, MIN y AA presentaron incremento significativo ($p < 0,001$) entre el grupo de infectado (EEV: $30,35 \pm 0,33$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al compararlo con el resto de los grupos estudiados (Control: $9,88 \pm 0,54$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT 0,5 mM: $8,10 \pm 0,52$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MIN 0,1 μM : $13,96 \pm 1,96$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA 25,0 μM : $11,57 \pm 1,05$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). También se evidenció disminución significativa ($p < 0,01$) entre el grupo infectado y tratado con MLT 0,5 mM (EEV+MLT 0,5 mM: $8,10 \pm 0,52$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y los grupos infectados que recibieron pretratamiento de MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM (EEV+MIN 0,1 μM : $13,96 \pm 1,96$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA 25,0 μM : $11,57 \pm 1,05$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente), además pudieron evidenciarse diferencias significativas ($p < 0,01$) entre el grupo infectado y tratado con MIN 0,1 μM (EEV+MIN 0,1 μM) y el control (Control: $9,88 \pm 0,54$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 2A).

En relación a las dosis de concentración intermedia de MLT, MIN y AA evaluadas en células de neuroblastoma múrido infectadas con el virus de EEV se objetivó un aumento significativo ($p < 0,001$) de la concentración de NO, entre el grupo infectado no tratado (EEV: $30,35 \pm 0,33$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al compararlo con el resto

de los grupos evaluados (Control: $9,88 \pm 0,54$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT 1,0 mM: $12,64 \pm 2,23$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MIN 0,2 μM : $19,91 \pm 2,89$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA 50,0 μM : $21,57 \pm 1,05$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Por su parte, se evidenció disminución significativa ($p < 0,01$) entre el grupo infectado y tratado con MLT 1,0 mM (EEV+MLT 1,0 mM) en relación a los grupos de infectados y pretratados con MIN 0,2 μM (EEV+MIN 0,2 μM) y el pretratado con AA 50,0 μM (EEV+AA 50,0 μM). Así mismo, el grupo infectado y pretratado con MIN 0,2 μM (EEV+MIN 0,2 μM : $19,91 \pm 2,89$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y con AA 50,0 μM (EEV+AA 50,0 μM : $21,57 \pm 1,05$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) presentaron incremento significativo ($p < 0,01$) cuando se compararon con el control (Control: $9,88 \pm 0,54$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y el grupo infectado y tratado con MLT 1,0 mM (EEV+MLT 1,0 mM) (Figura 2B).

Al analizar las concentraciones de NO en cultivos de células de neuroblastoma múrido infectadas con el virus de EEV y pretratadas con dosis de mayor concentración de MLT, MIN y AA se observa incremento significativo ($p < 0,01$) entre el grupo infectado y no tratado (EEV: $30,35 \pm 0,33$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) en relación al resto de los grupos (Control: $9,88 \pm 0,54$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT 5,0 mM: $12,49 \pm 0,61$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MIN 2,0 μM : $12,02 \pm 1,95$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA 75,0 μM : $17,96 \pm 0,44$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). A su vez, el grupo infectado y tratado con AA 75,0 μM (EEV+AA 75,0 μM : $17,96 \pm 0,44$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) presentó diferencia significativa ($p < 0,01$) con el resto de los grupos estudiados (Figura 2C).

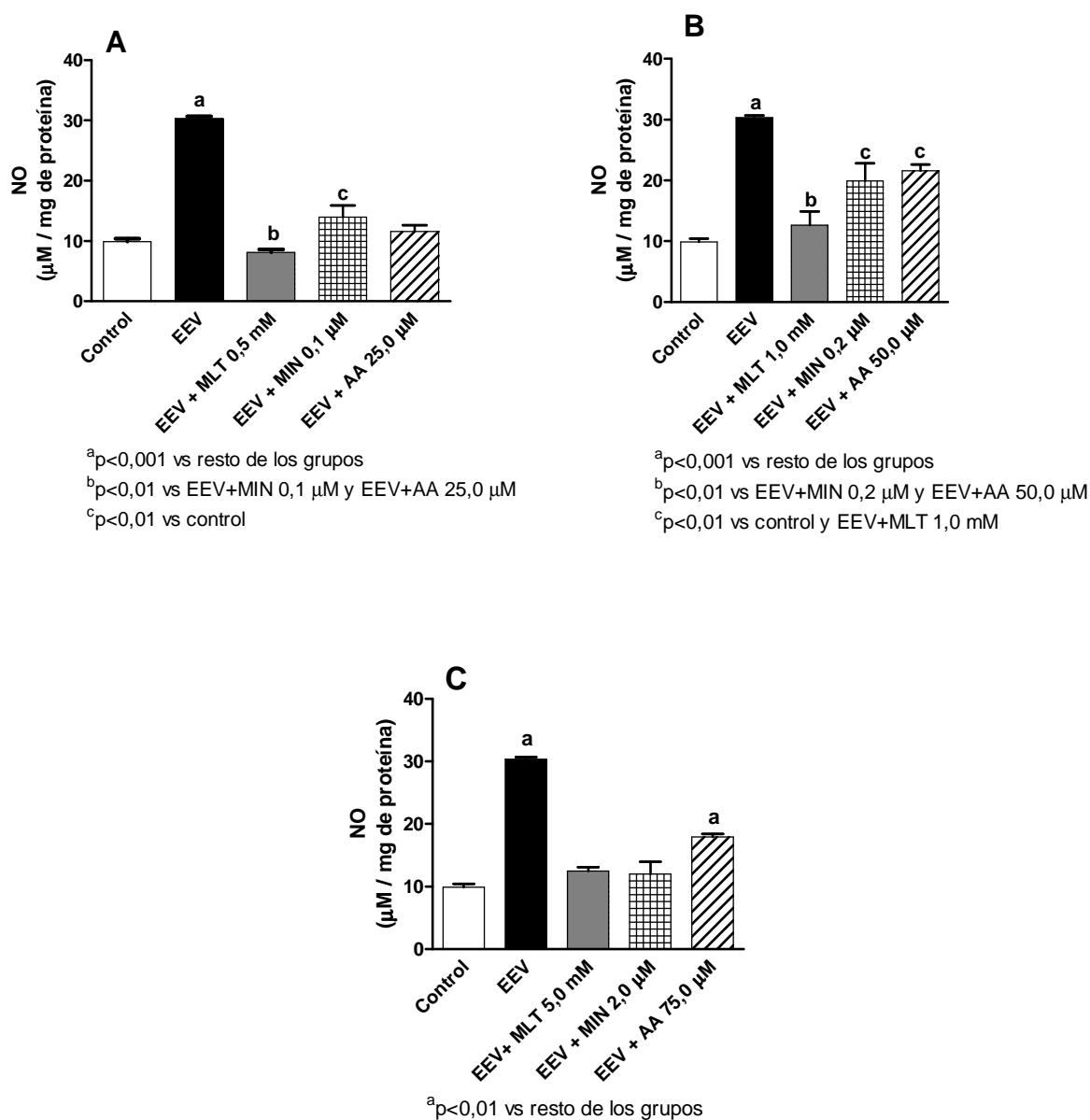


Figura 2. Concentraciones de NO en cultivos celulares infectados con el virus de EEV bajo tratamiento con MLT, MIN y AA a concentración menor (A), concentración intermedia (B) y concentración mayor (C). La concentración se determinó por la reacción de Griess. Los datos representan $X \pm DE$ de cinco ensayos. La significancia estadística fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 1.3.- Determinación de las concentraciones de MDA en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na₂) infectados por el virus de EEV, tratados con MLT, MIN y AA utilizando diferentes dosis de tratamiento.

Al determinar la concentración de MDA en cultivos de neuroblastoma múrido infectados con EEV a las 24 p.i. y pretratados con dosis de menor concentración de MLT, MIN y AA se observó incremento significativo ($p < 0,001$) entre el grupo de EEV ($10,33 \pm 0,94$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al compararlo con el resto de los grupos estudiados (Control: $2,17 \pm 0,33$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT 0,5 mM: $1,40 \pm 0,34$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MIN 0,1 μM : $3,10 \pm 0,32$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA 25,0 μM : $3,80 \pm 0,41$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). En relación al grupo infectado y tratado con MLT 0,5 mM (EEV+MLT 0,5 mM) se evidenció disminución significativa ($p < 0,01$) al compararlo con el grupo infectado y tratado con MIN 0,1 μM (EEV+MIN 0,1 μM) y el infectado y tratado con AA 25,0 μM (EEV+AA 25,0 μM). Con respecto al grupo infectado y tratado con AA 25,0 μM se observó aumento significativo ($p < 0,01$) con respecto al grupo control (Figura 3A).

En cuanto a las dosis intermedias de MLT, MIN y AA analizadas en células de neuroblastoma múrido infectadas con el virus de EEV se evidenció aumento significativo ($p < 0,001$) de la concentración de MDA, entre el grupo infectado no tratado (EEV: $10,33 \pm 0,94$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al evaluarlo con el restante de los grupos estudiados (Control: $2,17 \pm 0,33$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT 1,0 mM: $2,33 \pm 0,50$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MIN 0,2 μM : $3,18 \pm 0,96$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA 50,0 μM : $5,49 \pm 0,41$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). De igual forma, el grupo infectado

y tratado con AA 50,0 μ M presentó aumento significativo ($p < 0,001$) con el resto de los grupos evaluados (Figura 3B).

En relación a las concentraciones de MDA en cultivo de células de neuroblastoma m \acute rido infectados por el virus de EEV bajo pretratamiento con dosis de concentración mayor de MLT, MIN y AA se evidenci \acute un aumento significativo ($p < 0,001$) entre el grupo infectado y no tratado (EEV: $10,33 \pm 0,94$ μ M/mg de prote \acute na) en comparaci \acute n con el resto de los grupos (Control: $2,17 \pm 0,33$ μ M/mg de prote \acute na; EEV+MLT 5,0 mM: $3,16 \pm 0,21$ μ M/mg de prote \acute na; EEV+MIN 2,0 μ M: $3,65 \pm 0,70$ μ M/mg de prote \acute na y EEV+AA 75,0 μ M: $6,62 \pm 0,80$ μ M/mg de prote \acute na). As \acute mismo, el grupo infectado y tratado con AA 75,0 μ M mostr \acute incremento significativo con el resto de los grupos (Figura 3C).

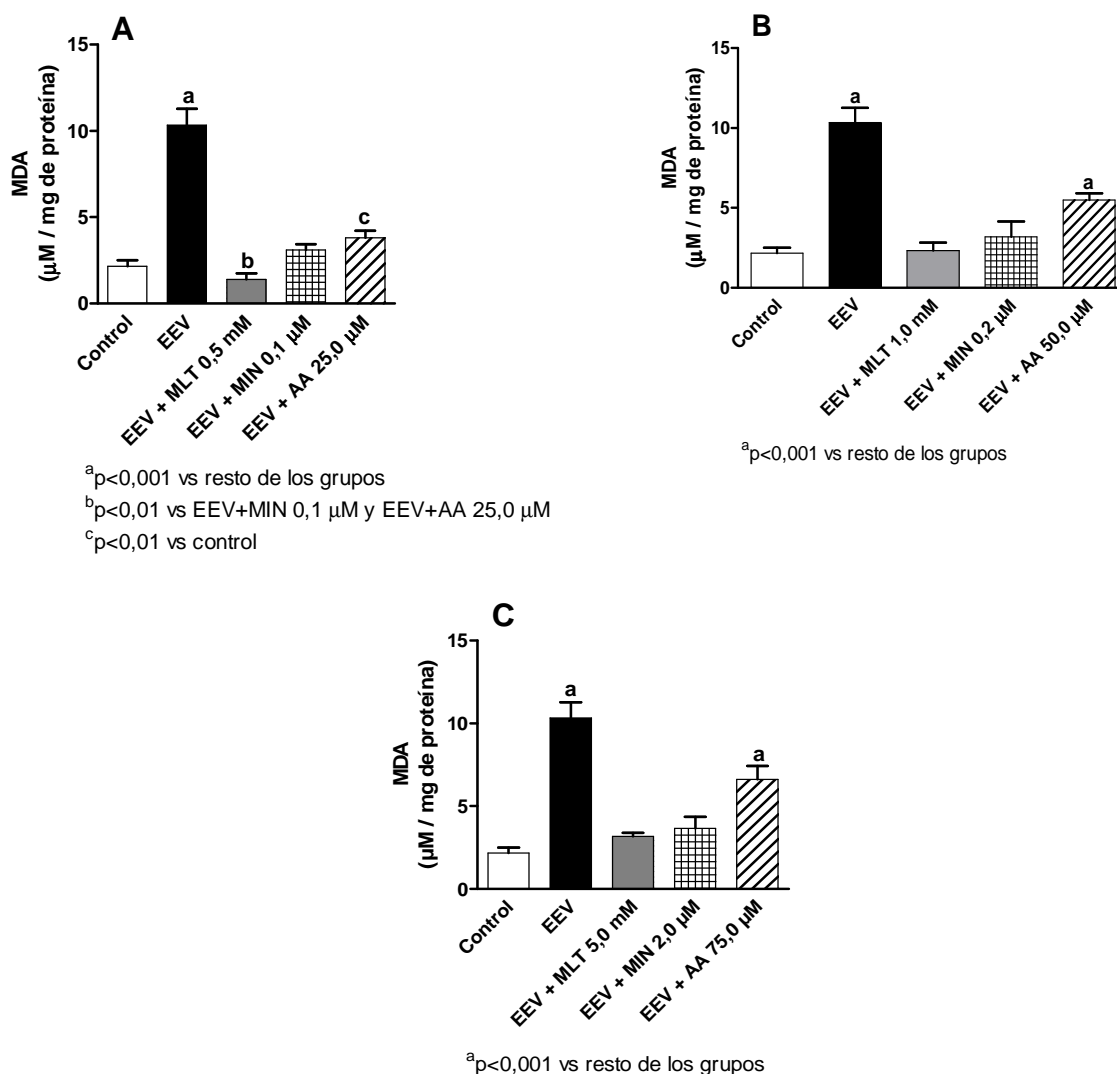


Figura 3. Concentraciones de MDA en cultivos celulares bajo tratamiento con MLT, MIN y AA a concentración menor (A), concentración intermedia (B) y concentración mayor (C). La concentración se determinó por el ensayo de ácido tiobarbiturico. Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de cinco ensayos. La significancia estadística fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 1.4.- Evaluación del efecto de los antioxidantes bajo tratamiento individual y combinado sobre la replicación viral en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na₂) infectados por el virus de EEV.

Al evaluar el efecto de MLT, MIN y AA bajo tratamiento individual y combinado sobre la replicación viral en cultivos de células de neuroblastoma múrido infectados por el virus de EEV se evidenció que los títulos del grupo infectado no tratado (EEV: $6,23 \pm 2,51 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) fueron incrementados significativamente ($p < 0,0001$) al compararlo con el resto de los grupos (EEV+MLT 0,5 mM: $1,60 \pm 0,10 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN 0,1 μ M: $2,40 \pm 0,10 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+AA 25,0 μ M: $4,03 \pm 0,25 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M: $1,00 \pm 0,15 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN 0,1 μ M+AA 25,0 μ M: $1,96 \pm 0,15 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+ MLT 0,5 mM+AA 25,0 μ M: $2,16 \pm 0,41 \times 10^3$ UFP/mg de proteína).

Así mismo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre el grupo infectado y pretratado con AA 25,0 μ M (EEV+AA 25,0 μ M) y el infectado y pretratado con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μ M (EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M) en relación al resto de los grupos. Con respecto al grupo infectado y tratado con MLT 0,5 mM (EEV+MLT 0,5 mM: $1,60 \pm 0,10 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) se mostró disminución significativa ($p < 0,05$) al compararlo con el grupo infectado (EEV: $6,23 \pm 2,51 \times 10^3$ UFP/mg de proteína), el infectado y tratado con MIN 0,1 μ M (EEV+MIN 0,1 μ M: $2,40 \pm 0,10 \times 10^3$ UFP/mg de proteína) y el grupo infectado y tratado con AA 25,0 μ M (EEV+AA 25,0 μ M: $4,03 \pm 0,25 \times 10^3$ UFP/mg de proteína).

En el grupo infectado y tratado con MIN 0,1 μ M (EEV+MIN 0,1 μ M) se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) con el infectado (EEV), el grupo infectado y tratado con MLT 0,5 mM (EEV+MLT 0,5 mM), el tratado con la combinación MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μ M e infectado (EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M) y el infectado y tratado con AA 25,0 μ M (EEV+AA 25,0 μ M) (Figura 4).

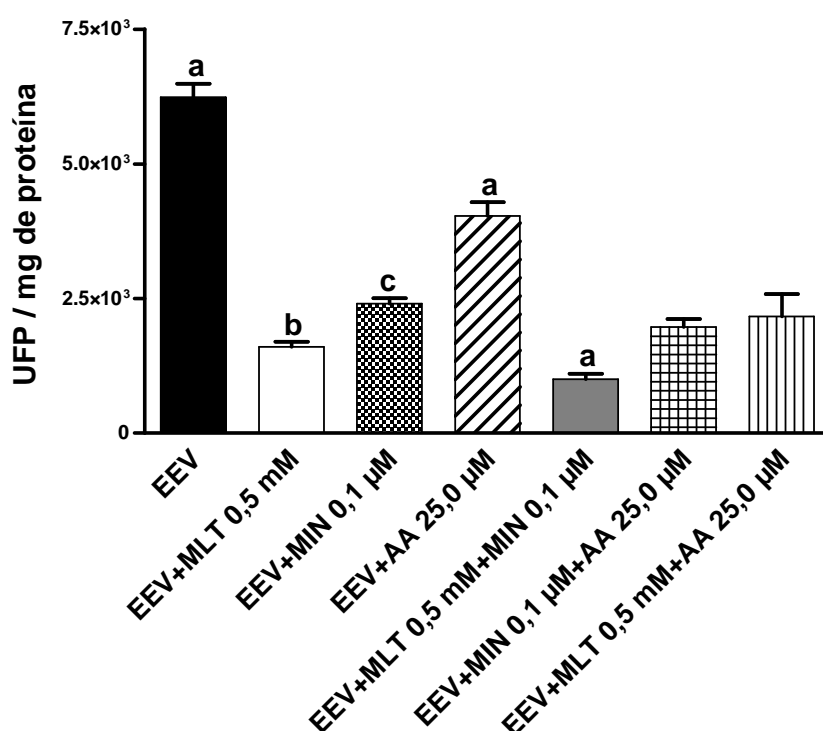


Figura 4. Titulación viral en cultivos celulares infectados con el virus de EEV bajo tratamiento individual y combinado con MLT, MIN y AA. Los títulos de infectividad viral se determinaron por la técnica de plaqueo. Los datos representan $X \pm DE$ de cinco ensayos. La significancia estadística fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p < 0,0001$ vs resto de los grupos. ^b $p < 0,05$ vs EEV; EEV+MIN 0,1 μ M y EEV+AA 25,0 μ M. ^c $p < 0,05$ vs EEV; EEV+MLT 0,5 mM; EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M y EEV+AA 25,0 μ M.

IV. 1.5.- Análisis del efecto del tratamiento combinado de los antioxidantes sobre la producción de NO en cultivos de células de neuroblastoma múrido (Na₂) infectados por el virus de EEV.

Al analizar las concentraciones de NO en cultivos de células de neuroblastoma múrido infectados por el virus de EEV y bajo el tratamiento combinado de MLT, MIN y AA, se objetivó un incremento significativo ($p < 0,001$) entre el infectado (EEV: $30,07 \pm 0,49$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), el grupo no infectado tratado con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μM (MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μM : $23,18 \pm 0,53$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), el tratado con MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM no infectado (MIN 0,1 μM +AA 25,0 μM : $17,68 \pm 0,57$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y el infectado tratado con la combinación MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM (EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 μM : $14,01 \pm 0,31$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al resto de los grupos estudiados.

Por otra parte, el grupo no infectado tratado con MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM (EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 μM) presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto al control, al infectado (EEV), a los grupos no infectados tratados con las combinaciones de MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μM (MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μM), MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM (MIN 0,1 μM +AA 25,0 μM) y a los grupos infectados y tratados con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μM (EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μM) y MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM (EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 μM).

Con respecto al grupo infectado y tratado con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μ M (EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M) objetivó diferencias significativas ($p<0,01$) al compararlo con el infectado (EEV), los grupos no infectados tratados con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μ M (MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M), MIN 0,1 μ M y AA 25,0 μ M no infectado (MIN 0,1 μ M+AA 25,0 μ M), MLT 0,5 mM y AA 25,0 μ M (MLT 0,5 mM+AA 25,0 μ M) y a los grupos infectados y tratados con las combinación MIN 0,1 μ M y AA 25,0 μ M y MLT 0,5 mM y AA 25,0 μ M, respectivamente.

En referencia al grupo infectado y tratado con MIN 0,1 μ M y AA 25,0 μ M se encontró disminución significativa ($p<0,01$) en relación al grupo infectado no tratado (EEV), al tratado con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μ M (MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M), al grupo tratado con la combinación MIN 0,1 μ M y AA 25,0 μ M no infectado (MIN 0,1 μ M+AA 25,0 μ M), el correspondiente al tratado con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μ M infectado (EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μ M) y al infectado tratado con MLT 0,5 mM y AA 25,0 μ M (EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 μ M) (Figura 5).

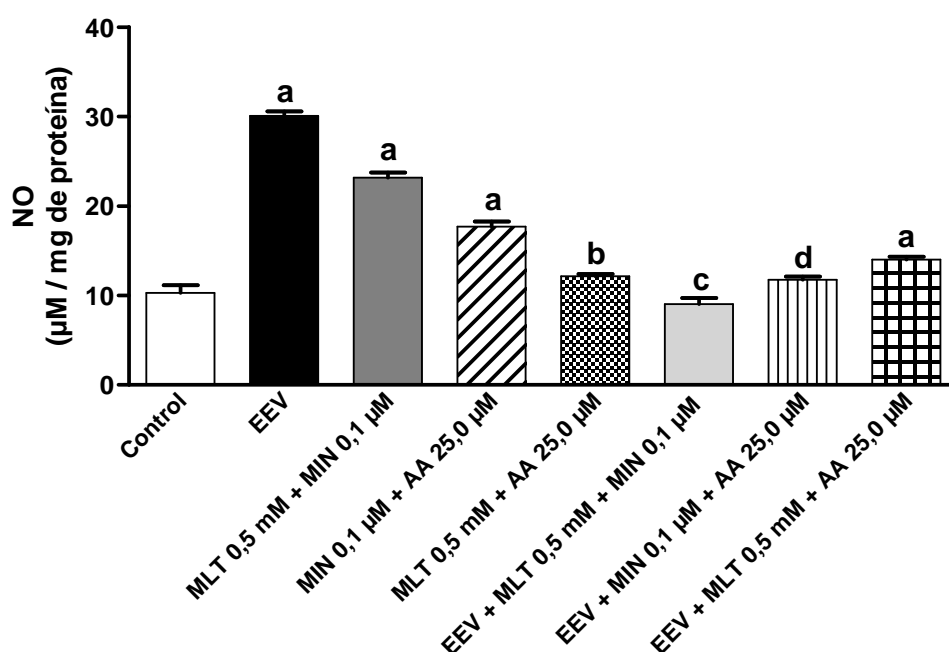


Figura 5. Concentraciones de NO en cultivos celulares infectados con el virus de EEV bajo tratamiento combinado de MLT, MIN y AA. La concentración se determinó por la reacción de Griess. Los datos representan $\bar{X} \pm DE$ de cinco ensayos. La significancia estadística fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p < 0,001$ vs resto de los grupos. ^b $p < 0,01$ vs control; EEV; MLT 0,5 mM+MIN 0,1 µM; MIN 0,1 µM+AA 25,0 µM; EEV+MLT 0,5 mM+MIN 0,1 µM y EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 µM. ^c $p < 0,001$ vs EEV; MLT 0,5 mM+MIN 0,1 µM; MIN 0,1 µM+AA 25,0 µM; MLT 0,5 mM+AA 25,0 µM; EEV+MIN 0,1 µM+AA 25,0 µM y EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 µM. ^d $p < 0,01$ vs EEV; MLT 0,5 mM+MIN 0,1 µM y EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 µM.

IV. 1.6.- Concentraciones de MDA en cultivos de células de neuroblastoma mürido (Na_2) infectados por el virus de EEV bajo tratamiento combinado de MLT, MIN y AA.

Al determinar la concentración de MDA en cultivos de células de neuroblastoma mürido infectados por el virus de EEV bajo tratamiento combinado

con MLT, MIN y AA se evidenció aumento significativo ($p < 0,001$) entre el grupo infectado no tratado (EEV: $19,87 \pm 1,43 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y el no infectado y tratado con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μM (MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μM : $10,33 \pm 0,94 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al resto de los grupos estudiados (Control: $2,17 \pm 0,33 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; MIN 0,1 μM +AA 25,0 μM : $7,10 \pm 0,52 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; MLT 0,5 mM+AA 25,0 μM : $7,76 \pm 0,55 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+ MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μM : $4,60 \pm 0,90 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MIN 0,1 μM +AA 25,0 μM : $5,62 \pm 0,50 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 μM : $5,70 \pm 0,43 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Por otra parte, objetivó disminución significativa ($p < 0,05$) en el grupo no infectado tratado con la combinación MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM en relación al resto de los grupos a excepción, del grupo no infectado y tratado con la combinación MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM .

El grupo no infectado tratado con la combinación MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) con el resto de los grupos a excepción del grupo no infectado y tratado con MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM . En los grupos infectados y tratados con las combinaciones de MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μM (EEV+ MLT 0,5 mM+MIN 0,1 μM), MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM (EEV+MIN 0,1 μM +AA 25,0 μM) y el tratado con MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM (EEV+MLT 0,5 mM+AA 25,0 μM) se observó disminución significativa ($p < 0,01$) al ser comparados con el control, el grupo infectado no tratado (EEV), y los grupos no infectados y tratados con MLT 0,5 mM y MIN 0,1 μM , MIN 0,1 μM y AA 25,0 μM y MLT 0,5 mM y AA 25,0 μM (Figura 6).

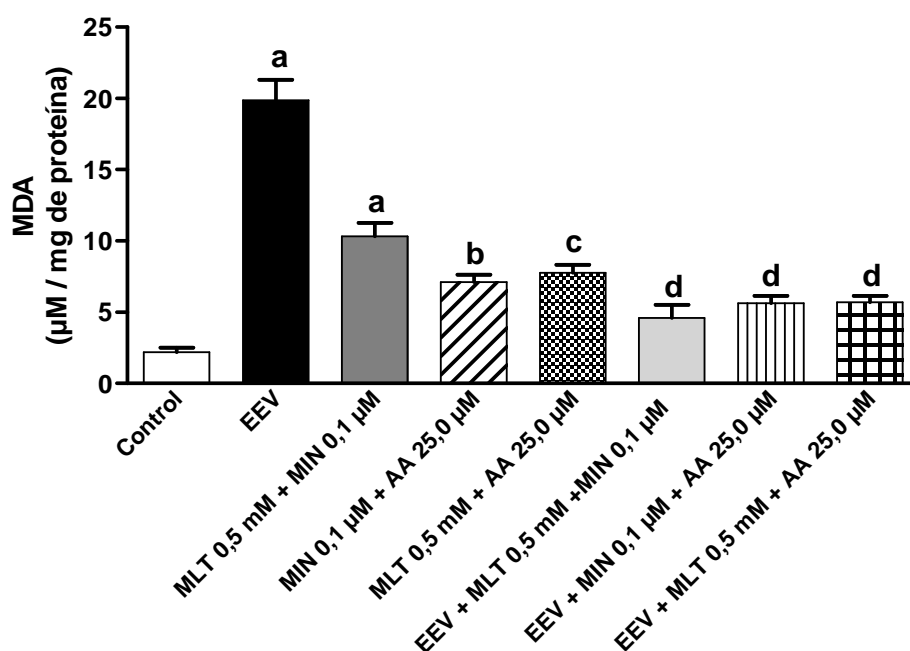


Figura 6. Concentraciones de MDA en cultivos celulares infectados con el virus de EEV bajo tratamiento combinado de MLT, MIN y AA. La concentración se determinó por el ensayo de ácido tiobarbiturico. Los datos representan $X \pm DE$ de cinco ensayos. La significancia estadística fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p < 0,001$ vs resto de los grupos. ^b $p < 0,05$ vs resto de los grupos a excepción de MLT 0,5 mM+AA 25,0 µM. ^c $p < 0,01$ vs resto de los grupos a excepción de MIN 0,1 µM+AA 25,0 µM. ^d $p < 0,01$ vs control; EEV; MLT 0,5 mM+MIN 0,1 µM; MIN 0,1 µM+AA 25,0 µM y MLT 0,5 mM+AA 25,0 µM.

IV. 2.- Estudios *in vivo*

IV. 2.1.- Evaluación del efecto en la sobrevida durante la infección por el virus de EEV utilizando tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA.

En el 6^{to} y 7^{mo} día p.i. en los ratones que recibieron la inoculación viral (10 DL₅₀ de EEV/ratón) la tasa de sobrevida fue de 45% y 0% respectivamente, que resultó

significativamente menor ($p < 0,001$) al compararla con el grupo de animales infectados que recibieron el esquema de tratamiento preventivo con los antioxidantes en forma individual o combinados: EEV+MLT (75% y 45%), EEV+MIN (65% y 50%), EEV+AA (70% y 45%), EEV+MLT+MIN (75% y 60%) y EEV+MIN+AA (65% y 55%) (Figura 7).

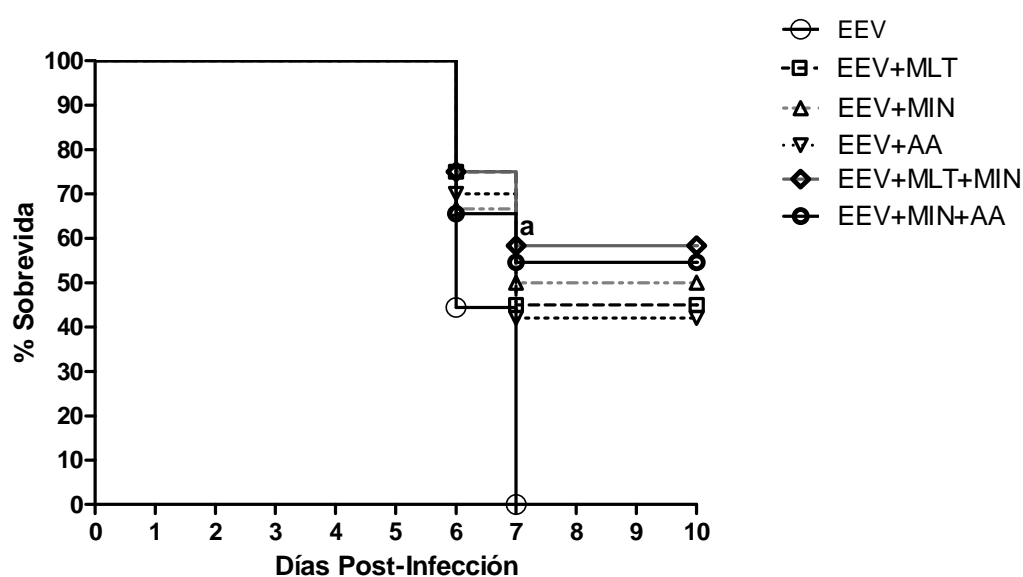


Figura 7. Curva de supervivencia en ratones infectados por el virus de EEV utilizando el esquema de tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA. Los ratones albinos machos ($n=15/\text{grupo}$) fueron infectados intraperitonealmente con 10DL_{50} de la cepa Guajira del virus de EEV. La MLT ($500 \mu\text{g}/\text{Kg}$), MIN ($50 \text{mg}/\text{Kg}$) y AA ($50 \text{mg}/\text{Kg}$) fueron administrados 3 días antes de la inoculación viral. ^a $p < 0,001$ entre los grupos de tratamiento preventivo cuando se compararon con el control. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

No se pudieron incluir los ensayos correspondientes al tratamiento con MLT+AA en ratones infectados o no con EEV, ni la utilización de otras dosis, debido a dificultades en la adquisición de ratones.

Los títulos de anticuerpos IgM anti EEV en los ratones sobrevivientes, fueron muy altos ubicándose dentro de un rango de 1: 2560 a 1: 5120 y de 1: 640 a 1: 1280, a las tres y siete semanas después de la inoculación del virus, respectivamente.

IV. 2.2.- Efecto de los antioxidantes sobre la replicación viral en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV.

En los ensayos *in vivo* los títulos virales en homogeneizados cerebrales al 1^{er} día p.i. en el grupo de ratones infectados (EEV) fue de $3,23 \pm 0,37 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; este valor estuvo incrementado ($p < 0,001$) al ser comparado con el resto de los grupos bajo tratamiento (EEV+MLT: $0,96 \pm 0,15 \times 10^3$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN: $1,23 \pm 0,30 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+AA: $2,40 \pm 0,26 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MLT+MIN: $1,16 \pm 0,20 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN+AA: $1,06 \pm 0,25 \times 10^4$ UFP/mg de proteína). En los grupos infectados y tratados con AA (EEV+AA), se encontraron títulos superiores ($p < 0,001$), con respecto al resto de los grupos infectados que recibieron pretratamiento, pero inferiores al grupo infectado no tratado (EEV) (Figura 8A).

Al 3^{er} día p.i., se observó un patrón similar al 1^{er} día p.i. con títulos virales doblemente incrementados. Se encontró que los títulos en homogeneizados cerebrales en los animales infectados con EEV ($6,23 \pm 0,25 \times 10^4$ UFP/mg de proteína) fueron mayores ($p < 0,001$) que el resto de los grupos estudiados (EEV+MLT: $2,46 \pm 0,25 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN: $2,33 \pm 0,40 \times 10^4$ UFP/mg de proteína;

EEV+AA: $4,03 \pm 0,25 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MLT+MIN: $1,56 \pm 0,25 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN+AA: $1,63 \pm 0,30 \times 10^4$ UFP/mg de proteína). En los grupos de animales infectados y tratados con AA (EEV+AA), los títulos virales fueron incrementados ($p < 0,001$) con relación al resto bajo tratamiento. Los ratones infectados y tratados con la combinación MLT y MIN (EEV+MLT+MIN) evidenciaron valores menores ($p < 0,05$) al compararlos con los ratones infectados y tratados individualmente (EEV+MIN y EEV+MLT) y con la combinación MIN y AA (EEV+MIN+AA) (Figura 8B).

Al 5^{to} día p.i., se observa el mismo patrón del 1^{er} y 3^{er} día, donde los títulos virales del grupo infectado no tratado (EEV: $1,18 \pm 0,25 \times 10^5$ UFP/mg de proteína) fueron superiores ($p < 0,0001$) al resto de los días y grupos evaluados (EEV+MLT: $4,80 \pm 0,20 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN: $4,93 \pm 0,75 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+AA: $6,20 \pm 0,45 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MLT+MIN: $3,73 \pm 0,45 \times 10^4$ UFP/mg de proteína; EEV+MIN+AA: $5,03 \pm 0,64 \times 10^4$ UFP/mg de proteína). En los grupos de animales infectados y tratados con AA (EEV+AA: $6,20 \pm 0,45 \times 10^4$ UFP/mg de proteína) los títulos virales fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) presentando diferencias al compararlo con el grupo infectado y tratado con la combinación MLT y MIN (EEV+MLT+MIN: $3,73 \pm 0,45 \times 10^4$ UFP/mg de proteína (Figura 8C).

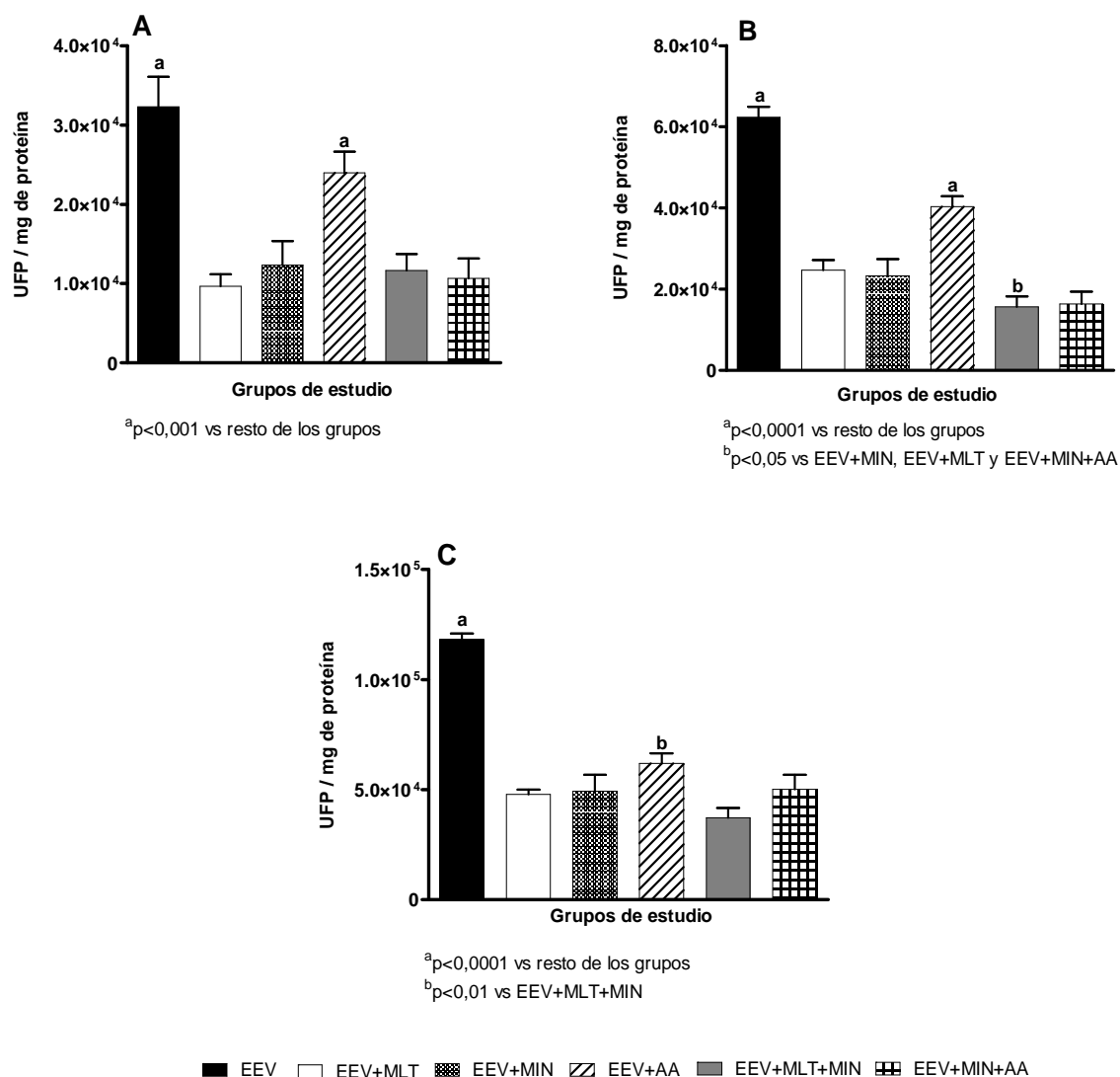


Figura 8. Titulación viral en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV bajo tratamiento individual y combinado con MLT, MIN y AA al 1^{er} (A), 3^{er} (B) y 5^{to} día p.i. (C). Los títulos de infectividad viral se determinaron por la técnica de plaqueo en homogeneizados cerebrales (n=5/grupo/ensayo). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 2.3.- Determinación del efecto de la MLT, MIN y AA sobre la generación de NO en suero de ratones infectados por el virus de EEV.

En los ensayos *in vivo* las concentraciones séricas de NO mostraron un significativo aumento ($p < 0,001$) en el grupo de ratones infectados (EEV: $141,50 \pm 1,26$ $\mu\text{M/ml}$) hacia el tercer día p.i. en relación a los grupos restantes, que se mantiene hasta el día 5^{to}. A su vez, en el grupo no infectado tratado con MLT se observó una disminución marcada ($p < 0,01$) de NO en el suero durante los días 1^{ero}, 3^{ero} y 5^{to} p.i., ($58,46 \pm 5,35$ $\mu\text{M/ml}$; $52,93 \pm 5,83$ $\mu\text{M/ml}$ y $59,31 \pm 8,59$ $\mu\text{M/ml}$, respectivamente) con respecto a los controles ($80,97 \pm 2,79$ $\mu\text{M/ml}$; $83,09 \pm 3,18$ $\mu\text{M/ml}$; $81,37 \pm 4,43$ $\mu\text{M/ml}$). Los valores séricos de NO en el grupo de ratones infectados y tratados con MLT (MLT+EEV) disminuyeron ($p < 0,01$) a partir del 3^{er} y hasta el 5^{to} día p.i. ($66,95 \pm 5,37$ $\mu\text{M/ml}$; $76,30 \pm 2,94$ $\mu\text{M/ml}$) con respecto al grupo infectado (EEV) (Figura 9A).

En lo que se refiere a la MIN, los niveles séricos de NO mostraron un aumento significativo ($p < 0,001$) en el grupo de ratones tratados no infectados (MIN: $150,00 \pm 12,57$ $\mu\text{M/ml}$) y el grupo infectado y tratado con MIN (EEV+MIN: $184,60 \pm 18,19$ $\mu\text{M/ml}$) hacia el 1^{er} día p.i. con relación al grupo control (Control: $80,97 \pm 2,79$ $\mu\text{M/ml}$) y al infectado no tratado (EEV: $71,62 \pm 6,03$ $\mu\text{M/ml}$). En el grupo infectado tratado con MIN (EEV+MIN) se observó una elevación ($p < 0,001$) de NO en el suero durante el 3^{er} y 5^{to} día p.i. ($318,80 \pm 18,55$ $\mu\text{M/ml}$; $475,30 \pm 24,00$ $\mu\text{M/ml}$, respectivamente) con respecto al resto de los grupos (Control: $83,09 \pm 3,18$ $\mu\text{M/ml}$;

81,37±4,43 $\mu\text{M/ml}$; MIN: 151,80±19,77 $\mu\text{M/ml}$; 161,00±19,52 $\mu\text{M/ml}$; EEV: 141,50±1,26 $\mu\text{M/ml}$; 105,20±8,15 $\mu\text{M/ml}$) (Figura 9B).

Las concentraciones de NO mostraron un aumento significativo ($p < 0,001$) el 1^{er} día p.i. en el suero de ratones infectados tratados con AA (EEV+AA: 346,60±8,72 $\mu\text{M/ml}$) y el grupo no infectado y tratado (AA: 270,60±13,56 $\mu\text{M/ml}$) con respecto al resto de los grupos (Control: 80,97±2,79 $\mu\text{M/ml}$; EEV: 71,62±6,03 $\mu\text{M/ml}$; AA: 270,60±13,56 $\mu\text{M/ml}$). Los valores séricos de NO en el grupo de ratones infectados tratados con AA (EEV+AA) aumentaron el 1^{er} día p.i. ($p < 0,001$) para decaer significativamente al 3^{er} día p.i. (145,20±17,03 $\mu\text{M/ml}$). Al 5^{to} día p.i. el grupo no infectado tratado (AA: 159,00±15,36 $\mu\text{M/ml}$) y el infectado y tratado (EEV+AA: 151,20±16,37 $\mu\text{M/ml}$) presentaron valores incrementados ($p < 0,001$) al compararlos con el control (Control: 81,37±4,43 $\mu\text{M/ml}$) y el grupo infectado no tratado (EEV: 105,20±8,15 $\mu\text{M/ml}$) (Figura 9C).

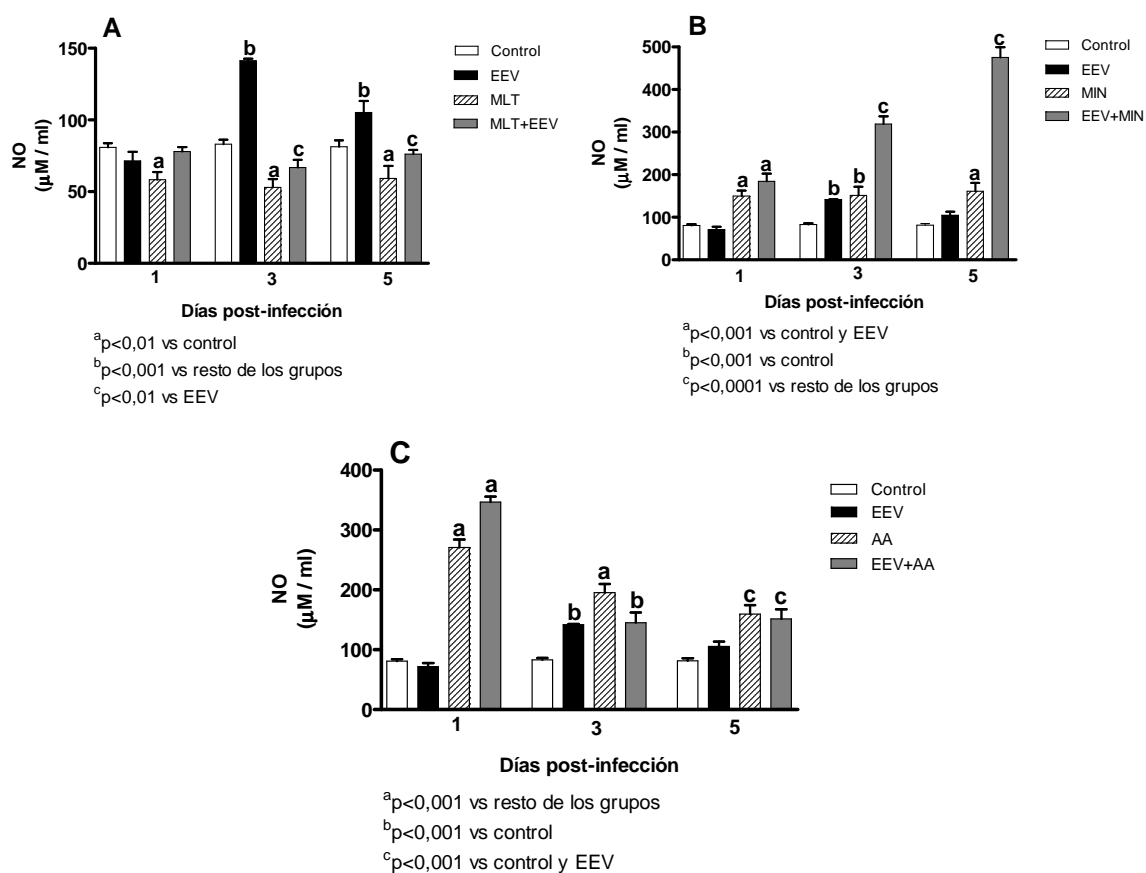


Figura 9. Concentraciones de NO en suero de ratones infectados por el virus de EEV tratados con MLT (A), MIN (B) y AA (C) a diferentes días p.i. La concentración se determinó por la reacción de Griess en el suero de ratones infectados (n=5/grupo/ensayo). Los datos representan $\bar{X} \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 2.4.- Concentraciones de MDA en suero de ratones infectados por el virus de EEV y pretratados con MLT, MIN y AA.

Con respecto a las concentraciones séricas de MDA en los grupos de ensayo de ratones no infectados tratados con MLT al 1^{er} día p.i. ($27,45 \pm 1,97 \mu\text{M/ml}$) se

observó aumento significativo ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos (Control: $13,05 \pm 1,63 \mu\text{M/ml}$; EEV: $17,27 \pm 2,09 \mu\text{M/ml}$; EEV+MLT: $12,33 \pm 1,91 \mu\text{M/ml}$). Durante el 3^{er} y 5^{to} día p.i. no se observaron cambios significativos en estos grupos (Figura 10A).

Los niveles de MDA en el suero de ratones infectados tratados con MIN (EEV+MIN) evidenciaron un incremento ($p < 0,001$) el 1^{er} día p.i., que luego disminuyó hacia el 5^{to} día ($29,44 \pm 2,51 \mu\text{M/ml}$; $7,68 \pm 1,44 \mu\text{M/ml}$; respectivamente) con respecto al resto de los grupos (Control: $13,05 \pm 1,63 \mu\text{M/ml}$, $12,68 \pm 1,10 \mu\text{M/ml}$; EEV: $17,27 \pm 2,09 \mu\text{M/ml}$; $17,32 \pm 1,69 \mu\text{M/ml}$; MIN: $16,76 \pm 1,61 \mu\text{M/ml}$, $15,43 \pm 1,86 \mu\text{M/ml}$). En el grupo de ratones no infectados tratados con MIN se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) al 3^{er} día p.i. (MIN: $27,33 \pm 1,90 \mu\text{M/ml}$) con respecto al resto de los grupos (Control: $11,48 \pm 1,18 \mu\text{M/ml}$; EEV: $13,02 \pm 1,18 \mu\text{M/ml}$; EEV+MIN: $17,80 \pm 2,32 \mu\text{M/ml}$) (Figura 10B).

Las concentraciones séricas de MDA durante el tratamiento con AA no evidenciaron cambios significativos durante los días de ensayo en los grupos estudiados (Figura 10C).

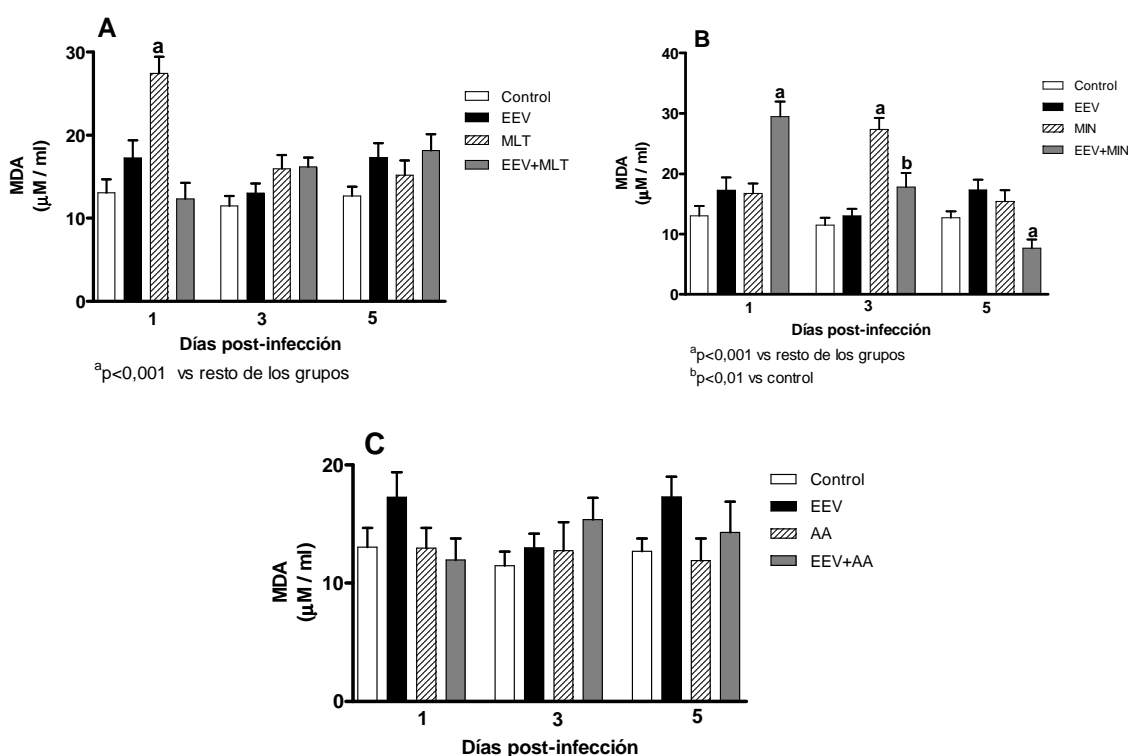


Figura 10. Concentraciones de MDA en suero de ratones infectados por el virus de EEV tratados con MLT (A), MIN (B) y AA (C) a diferentes días p.i. La concentración se determinó por el ensayo de ácido tiobarbiturico en el suero de ratones infectados (n=5/grupo/ensayo). Los datos representan $X \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 2.5.- Determinación del efecto del tratamiento combinado de los antioxidantes sobre la producción de NO en suero de ratones infectados por el virus de EEV.

En los ensayos combinados las concentraciones de NO en suero mostraron un incremento significativo ($p < 0,001$) en el grupo de ratones infectados: (EEV: $220,70 \pm 9,60 \mu\text{M/ml}$) al 3^{er} día p.i. con respecto a los grupos restantes (Control: $188,90 \pm 5,57 \mu\text{M/ml}$; MLT+MIN: $159,10 \pm 12,30 \mu\text{M/ml}$; MIN+AA: $95,95 \pm 7,01 \mu\text{M/ml}$;

EEV+MLT+MIN: $123,80 \pm 6,91$ $\mu\text{M/ml}$; EEV+MIN+AA: $102,50 \pm 10,05$ $\mu\text{M/ml}$). Los días 3^{ero} y 5^{to} p.i. los ratones no infectados tratados con MLT y MIN ($159,10 \pm 12,30$ $\mu\text{M/ml}$; $137,80 \pm 11,27$ $\mu\text{M/ml}$, respectivamente) mostraron al 3^{er} día diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo infectado no tratado (EEV: $220,70 \pm 9,60$ $\mu\text{M/ml}$), no infectado tratado con la combinación MIN y AA ($95,95 \pm 7,01$ $\mu\text{M/ml}$) y al grupo infectado y tratado con MIN y AA (EEV+MIN+AA: $102,5 \pm 10,05$ $\mu\text{M/ml}$), mientras que al 5^{to} día p.i. se evidenció diferencia significativa ($p < 0,05$) con el control (Control: $188,10 \pm 10,02$ $\mu\text{M/ml}$) y el grupo infectado (EEV: $204,20 \pm 3,82$ $\mu\text{M/ml}$).

En los grupos de ratones infectados tratados con MLT y MIN (EEV+MLT+MIN) se observó una disminución durante el 1^{er} y 3^{er} día, pero luego incrementó significativamente al día 5^{to} p.i. ($104,30 \pm 3,21$ $\mu\text{M/ml}$; $123,80 \pm 6,91$ $\mu\text{M/ml}$; $226,10 \pm 8,96$ $\mu\text{M/ml}$, respectivamente), existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control (Control: $190,50 \pm 14,21$ $\mu\text{M/ml}$; $188 \pm 5,57$ $\mu\text{M/ml}$) y al grupo infectado no tratado (EEV: $151,50 \pm 15,52$ $\mu\text{M/ml}$ y $220,70 \pm 9,60$ $\mu\text{M/ml}$) durante el 1^{er} y 3^{er} día p.i., mientras que al 5^{to} día se evidenció diferencias significativas ($p < 0,01$) con el resto de los grupos.

De igual manera en los grupos no infectados tratados con MIN y AA se registró disminución ($p < 0,05$) durante los días 1^{ero}, 3^{ero} y 5^{to} p.i. ($101,50 \pm 10,56$ $\mu\text{M/ml}$, $95,95 \pm 7,01$ $\mu\text{M/ml}$ y $121,00 \pm 14,27$ $\mu\text{M/ml}$, respectivamente) con respecto a los controles y al grupo infectado (EEV). En los grupos de ratones infectados tratados

con MIN y AA (EEV+MIN+AA) se observó descenso significativo ($p < 0,05$) de las concentraciones séricas de NO en los días 1^{ero} y 3^{ero} p.i. (EEV+MIN+AA: $122,00 \pm 16,49 \mu\text{M/ml}$; $102,50 \pm 10,05 \mu\text{M/ml}$) en relación a los controles y al grupo infectado no tratado (EEV); y luego un aumento notorio ($p < 0,01$) (EEV+MIN+AA: $252,30 \pm 19,61 \mu\text{M/ml}$) al 5^{to} día p.i. con respecto al resto de los grupos estudiados (Figura 11).

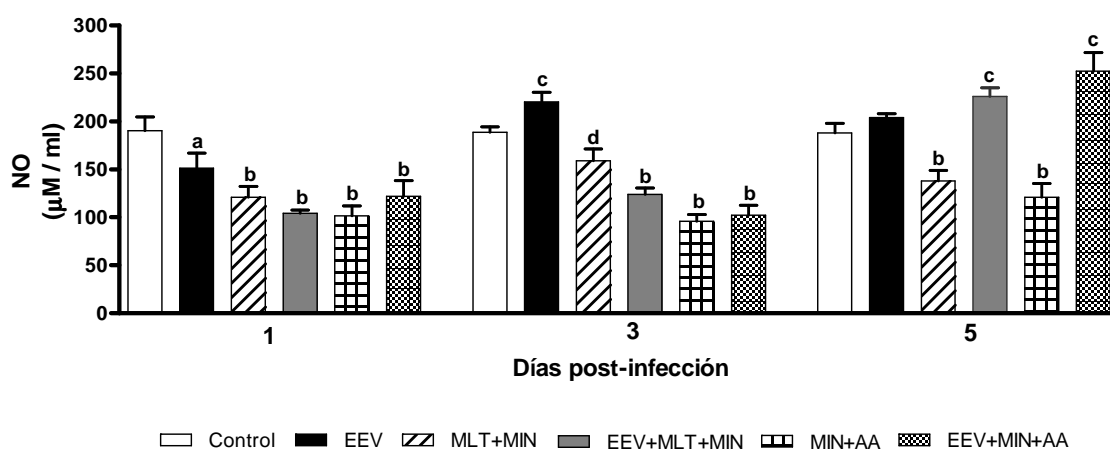


Figura 11. Concentraciones de NO en suero de ratones infectados con el virus de EEV tratados bajo tratamiento combinado de MLT, MIN y AA. La concentración se determinó por la reacción de Griess en el suero de ratones infectados ($n=5/\text{grupo}/\text{ensayo}$). Los datos representan $\bar{X} \pm \text{DE}$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p < 0,001$ vs control; EEV+MLT+MIN y MIN+AA. ^b $p < 0,05$ vs control y EEV. ^c $p < 0,01$ vs resto de los grupos. ^d $p < 0,05$ vs EEV; MIN+AA y EEV+MIN+AA.

IV. 2.6.- Determinación de las concentraciones de MDA en suero de ratones infectados por el virus de EEV bajo pretratamiento combinado con MLT, MIN y AA.

A los días 1^{ero} y 3^{ero} p.i. con respecto a las concentraciones séricas de MDA en los ensayos combinados, se observó incremento significativo ($p < 0,05$) en el grupo de ratones infectados (EEV: $17,27 \pm 2,09$ $\mu\text{M/ml}$ y $13,02 \pm 1,1$ $\mu\text{M/ml}$, respectivamente) con relación al grupo control (Control: $13,05 \pm 1,63$ $\mu\text{M/ml}$; $11,48 \pm 1,18$ $\mu\text{M/ml}$ y $8,3 \pm 1,01$ $\mu\text{M/ml}$), al grupo no infectado tratado con MLT y MIN ($9,82 \pm 0,60$ $\mu\text{M/ml}$, $8,82 \pm 0,60$ $\mu\text{M/ml}$), al infectado y tratado con MLT y MIN (EEV+MLT+MIN: $4,90 \pm 1,27$ $\mu\text{M/ml}$ y $4,64 \pm 0,91$ $\mu\text{M/ml}$) y al grupo no infectado tratado con la combinación MIN y AA (MIN+AA: $6,80 \pm 1,74$ $\mu\text{M/ml}$ y $5,15 \pm 0,67$ $\mu\text{M/ml}$), mientras que al 5^{to} día p.i. el grupo infectado (EEV: $17,32 \pm 1,69$ $\mu\text{M/ml}$) evidenció aumento significativo ($p < 0,01$) con el resto de los grupos (Control: $12,68 \pm 1,10$ $\mu\text{M/ml}$; MLT+MIN $13,13 \pm 1,45$ $\mu\text{M/ml}$; EEV+MLT+MIN: $4,66 \pm 0,29$ $\mu\text{M/ml}$; MIN+AA: $6,56 \pm 1,31$ $\mu\text{M/ml}$ y EEV+MIN+AA: $5,56 \pm 1,07$ $\mu\text{M/ml}$).

Los grupos de ratones no infectados tratados con MLT y MIN muestran diferencias significativas ($p < 0,01$) los días 1^{ero} y 3^{ero} p.i. en relación al resto de los grupos, aumentando la concentración el día 5^{to} (MLT+MIN: $13,13 \pm 1,45$ $\mu\text{M/ml}$). Los ratones del grupo infectado tratado con MLT y MIN (EEV+MLT+MIN) evidenciaron disminución marcada desde el 1^{er} al 5^{to} día ($4,96 \pm 1,27$ $\mu\text{M/ml}$, $4,64 \pm 0,91$ $\mu\text{M/ml}$ y

4,66±0,29 $\mu\text{M}/\text{ml}$), observándose diferencias significativas ($p<0,01$) en los días 1^{er} y 3^{er} con respecto al control, al infectado (EEV), al grupo tratado con MLT y MIN no infectado (MLT+MIN) y al grupo infectado tratado con la combinación MIN y AA (EEV+MIN+AA), mientras que al 5^{to} día p.i. evidenció diferencias significativas ($p<0,001$) con respecto al grupo control (Control: 12,68±1,10 $\mu\text{M}/\text{ml}$), al grupo infectado (EEV: 17,32±1,69 $\mu\text{M}/\text{ml}$) y al tratado con la combinación MLT y MIN no infectado (MLT+MIN: 13,13±1,45 $\mu\text{M}/\text{ml}$).

Los grupos de ratones infectados tratados con la combinación MIN y AA (EEV+MIN+AA) objetivaron una disminución paulatina y significativa ($p<0,05$) de las concentraciones séricas de MDA durante el 1^{er}, 3^{er} y 5^{to} día p.i. (Figura 12).

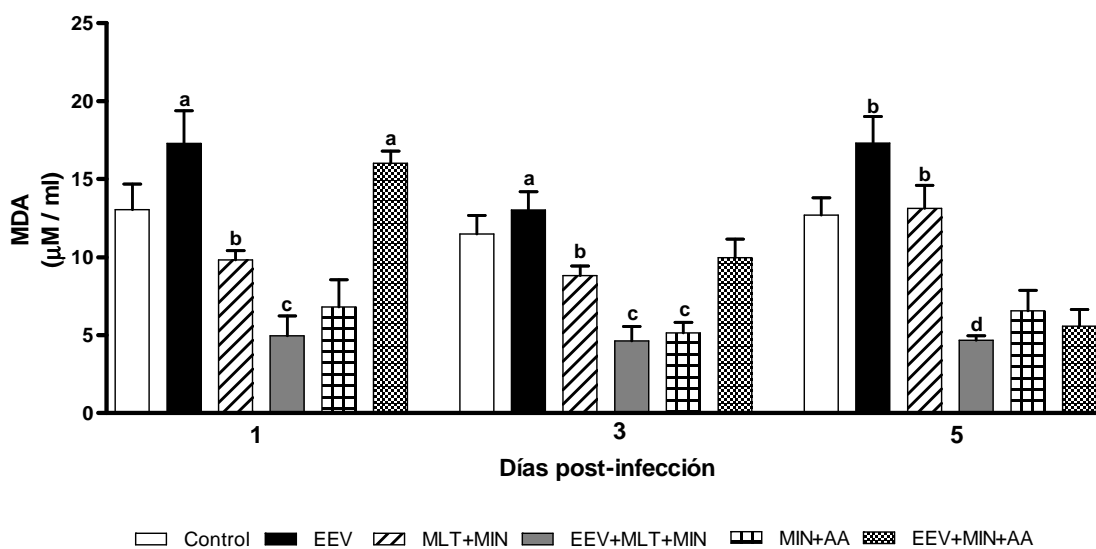


Figura 12. Concentraciones de MDA en suero de ratones infectados con el virus de EEV bajo tratamientos combinados con MLT, MIN y AA. La concentración se determinó por el ensayo de ácido tiobarbiturico en el suero de ratones infectados ($n=5/\text{grupo}/\text{ensayo}$). Los datos representan $\bar{X}\pm\text{DE}$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p<0,05$ vs control; MLT+MIN; EEV+MLT+MIN y MIN+AA. ^b $p<0,01$ vs resto de los grupos. ^c $p<0,01$ vs control; EEV; MLT+MIN y EEV+MIN+AA. ^d $p<0,001$ vs control; EEV y MLT+MIN.

IV. 2.7.- Análisis del efecto de la MLT, MIN y AA sobre la producción de NO en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV.

En los homogeneizados cerebrales, las concentraciones de NO fueron superiores a las evidenciadas en suero. En el grupo de ratones no infectados tratados con MLT se obtuvieron valores aumentados significativamente ($p < 0,0001$) sólo el 1^{er} día p.i. (MLT: $698,60 \pm 47,85$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al resto de los grupos (Control: $348,40 \pm 23,14$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV: $463,80 \pm 34,09$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV+MLT: $400,60 \pm 51,64$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína).

Los niveles de NO en los animales del grupo tratado con MLT mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) para el 3^{er} día p.i. ($560,50 \pm 26,67$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con relación al control (Control: $343,60 \pm 43,26$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y al grupo de ratones infectados y tratados con MLT (EEV+MLT: $400,60 \pm 51,64$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) quienes presentaron disminución para este día. Por otra parte, el día 5^{to} p.i. el grupo tratado con MLT no infectado (MLT: $522,60 \pm 50,67$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) presentó un incremento significativo ($p < 0,01$) con respecto al control (Control: $370,80 \pm 33,44$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), mientras que el infectado no tratado (EEV: $552,50 \pm 37,31$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación al grupo control y al infectado y tratado con MLT (EEV+MLT: $424,80 \pm 23,64$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 13A).

Con respecto a MIN, las concentraciones de NO en los homogeneizados cerebrales de ratones infectados tratados con MIN (EEV+MIN) se evidenció un incremento ($p < 0,01$) hacía el 3^{er} día p.i. (EEV+MIN: $570,70 \pm 44,09$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) en relación al grupo control (Control: $343,60 \pm 44,09$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), que se mantiene hasta el 5^{to} día p.i. (EEV+MIN: $646,60 \pm 39,46$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) existiendo un aumento significativo ($p < 0,001$) con respecto al control (Control: $370,80 \pm 33,44$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y al grupo no infectado tratado con MIN (MIN: $475,10 \pm 28,87$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 13B).

Los niveles de NO en los homogeneizados cerebrales en los grupos de animales infectados tratados con AA (AA+EEV) se incrementaron ($p < 0,001$) el 1^{er} día p.i. ($592,70 \pm 27,44$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al resto de los grupos (Control: $348,40 \pm 23,14$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV: $463,80 \pm 34,09$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y AA: $422,10 \pm 40,06$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína); para luego descender significativamente ($p < 0,001$) al 5^{to} día p.i. (AA+EEV: $366,30 \pm 21,18$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al grupo infectado (EEV: $552,50 \pm 37,31$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y al grupo tratado con AA no infectado (AA: $485,50 \pm 37,17$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 13C).

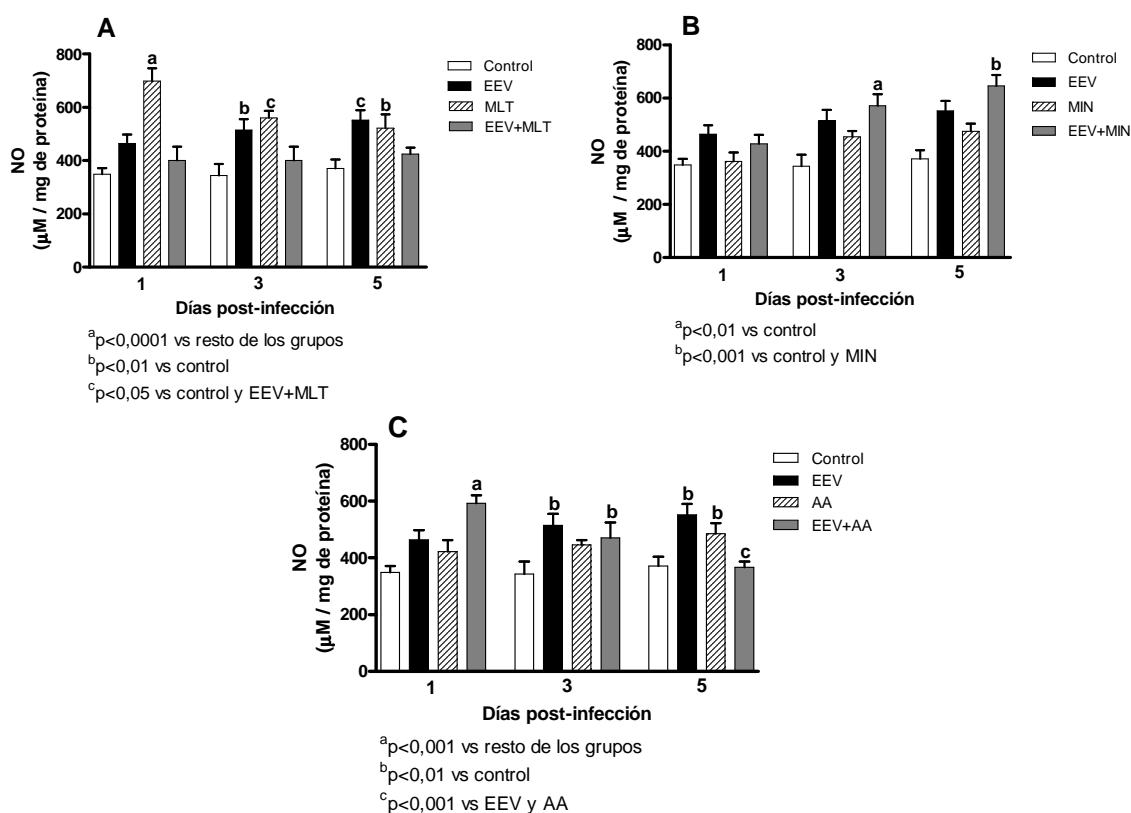


Figura 13. Concentraciones de NO en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV tratados con MLT (A), MIN (B) y AA (C). La concentración se determinó por la reacción de Griess en el suero de ratones infectados ($n=5/\text{grupo}/\text{ensayo}$). Los datos representan $X \pm \text{DE}$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 2.8.- Concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV tratados con los antioxidantes.

Los niveles de MDA en homogeneizados cerebrales, del mismo modo que los de NO, también se hallaron elevados con respecto a los del suero. En los homogeneizados cerebrales, las concentraciones de MDA mostraron aumento ($p < 0,05$) en el grupo de ratones infectados al 1^{er} día p.i (EEV: $484,30 \pm 7,42 \mu\text{M}/\text{mg}$ de

proteína) en relación al grupo control (Control: $399,80 \pm 5,15$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Para el día 3^{er} p.i. el grupo infectado no tratado (EEV: $472,20 \pm 36,20$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) presentó un incremento significativo ($p < 0,05$) con respecto al grupo control (Control: $406,10 \pm 5,36$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y al infectado y tratado con MLT (EEV+MLT: $377,40 \pm 21,97$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Al 5^{to} día p.i. en el grupo de infectado no tratado (EEV: $450,90 \pm 5,45$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) con respecto al control (Control: $335,10 \pm 15,12$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al grupo no infectado tratado con MLT (MLT: $382,40 \pm 7,35$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y al infectado tratado con MLT (EEV+MLT: $305,90 \pm 4,91$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), así como una disminución de los valores ($p < 0,05$) del grupo no infectado tratado con MLT (MLT) en relación al grupo infectado no tratado (EEV) y al grupo tratado con MLT e infectado (EEV+MLT) (Figura 14A).

Con respecto al tratamiento con MIN en los homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV, las concentraciones de MDA registraron valores incrementados ($p < 0,01$) el 1^{er} día p.i. ($484,30 \pm 7,42$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, con respecto al resto de los grupos (Control: $399,80 \pm 5,15$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; MIN: $427,90 \pm 18,42$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+MIN: $375,20 \pm 5,00$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), mientras que para el día 3^{er} y 5^{to} p.i. las concentraciones se mantuvieron incrementadas ($p < 0,01$) (EEV: $472,20 \pm 36,20$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; $450,9 \pm 5,45$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente) con respecto a los controles (Control: $406,10 \pm 5,36$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y $335,10 \pm 15,12$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y a los grupos infectados y

tratados con MIN (EEV+MIN: $204,10 \pm 5,23$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y $236,80 \pm 6,61$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Los niveles de MDA en los ratones no infectados tratados con MIN aumentaron significativamente ($p < 0,01$) con respecto al grupo control y al grupo infectado tratado con MIN los días 3^{er} y el 5^{to} p.i. ($491,00 \pm 5,60$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y $418,60 \pm 6,50$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente). En los homogeneizados cerebrales de ratones infectados y tratados con MIN (EEV+MIN), las concentraciones de MDA disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) desde el 3^{er} día hasta el 5^{to} día p.i. ($240,10 \pm 5,23$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y $236,80 \pm 6,61$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente) con respecto a los grupos restantes (Figura 14B).

Al 1^{er} día p.i se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) de las concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados no tratados con AA (EEV: $484,30 \pm 7,42$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al resto de los grupos (Control: $399,80 \pm 5,15$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; AA: $408,20 \pm 2,75$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+AA: $441,50 \pm 4,50$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), y en referencia al grupo infectado y tratado con AA (EEV+AA) se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en relación al control. Durante el 3^{er} día p.i. el grupo infectado y tratado con AA (EEV+AA: $322,40 \pm 9,37$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) presentó una disminución significativa ($p < 0,01$) con respecto al resto de los grupos estudiados (Control: $406,10 \pm 5,36$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV: $472,20 \pm 36,20$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y AA: $491,00 \pm 4,93$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) al igual que para el 5^{to} día p.i. (EEV+AA: $127,30 \pm 7,02$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) donde se observó disminución significativa

($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos estudiados (Control: $335,10 \pm 15,12$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; EEV: $450,90 \pm 5,45$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y AA: $407,80 \pm 2,39$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Por su parte, en el grupo no infectado y tratado con AA (AA) se evidenció incremento significativo ($p < 0,001$) con respecto al control y el grupo infectado y tratado con AA (EEV+AA) (Figura 14C).

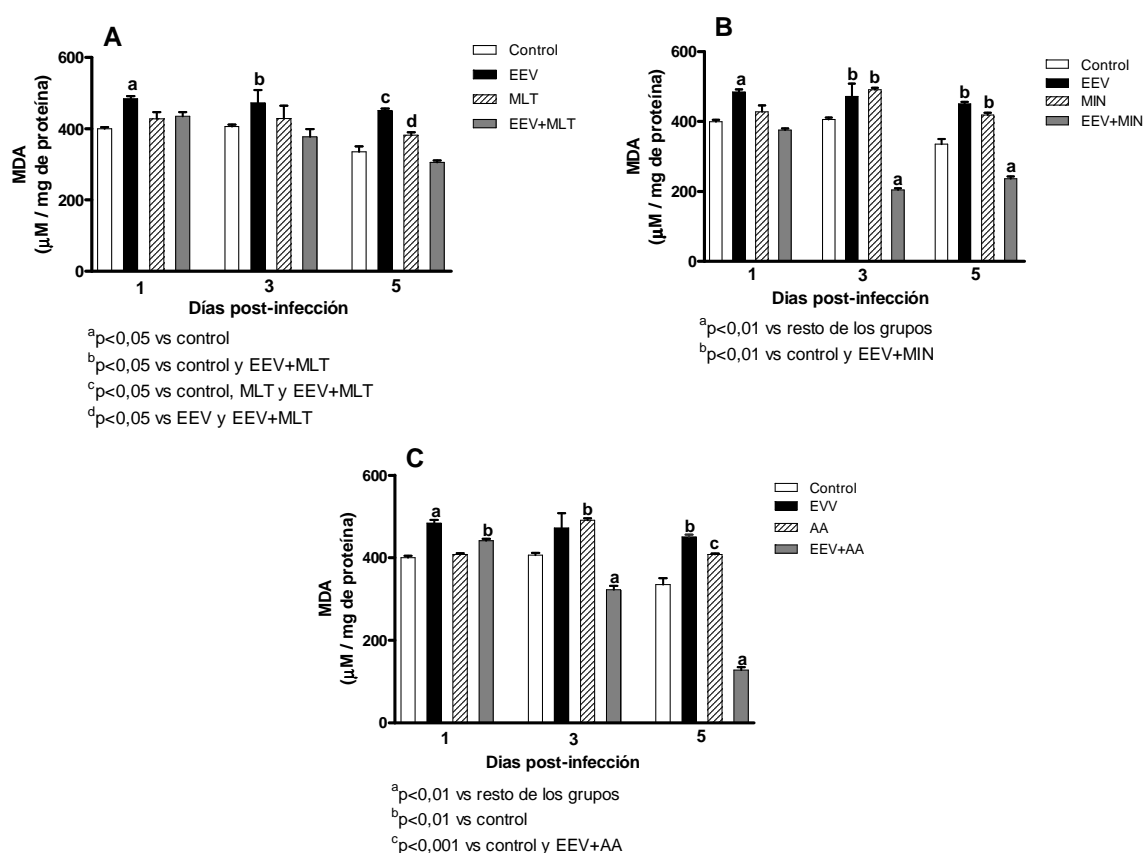


Figura 14. Concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV tratados con MLT (A), MIN (B) y AA (C). La concentración se determinó por el ensayo de ácido tiobarbiturico en el suero de ratones infectados ($n=5/\text{grupo}/\text{ensayo}$). Los datos representan $X \pm \text{DE}$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni.

IV. 2.9.- Efecto del tratamiento combinado de los antioxidantes sobre la producción de NO en homogeneizados cerebrales infectados por el virus de EEV.

En los ensayos combinados, las concentraciones de NO en homogeneizados presentaron aumento significativo ($p < 0,001$) en los grupos infectados no tratados en los días 1^{ero}, 3^{ero} y 5^{to} p.i (EEV: $525,80 \pm 19,45$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; $546,20 \pm 21,47$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y $644,10 \pm 12,18$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, respectivamente) en relación al resto de los grupos estudiados en los diferentes días. Para el 1^{er} día p.i. con respecto al grupo no infectado tratado con MIN y AA (MIN+AA: $461,10 \pm 20,76$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) se observó incremento significativo ($p < 0,05$) con el grupo no infectado tratado con MLT y MIN.

En el ensayo se objetivó que al 5^{to} día p.i. en los homogeneizados del grupo infectado y tratado con MIN y AA (EEV+MIN+AA: $305,20 \pm 28,02$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto al control (Control: $470,80 \pm 73,45$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), al infectado no tratado (EEV: $644,10 \pm 12,18$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y los grupos no infectados tratados con MLT y MIN (MLT+MIN: $419,40 \pm 27,89$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y la combinación MIN y AA (MIN+AA: $425,80 \pm 14,91$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) (Figura 15).

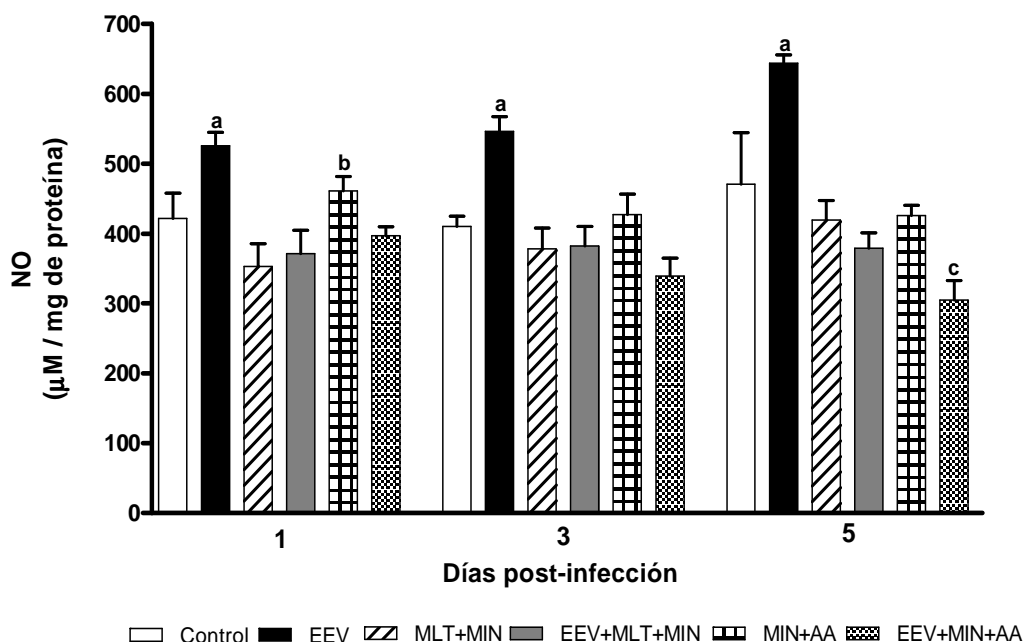


Figura 15. Concentraciones de NO en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV bajo tratamientos combinados con MLT, MIN y AA. La concentración se determinó por la reacción de Griess en el suero de ratones infectados ($n=5$ /grupo/ensayo). Los datos representan $X \pm DE$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p < 0,001$ vs resto de los grupos. ^b $p < 0,05$ vs MLT+MIN. ^c $p < 0,01$ vs control; EEV; MLT+MIN y MIN+AA.

IV. 2.10.- Determinación de las concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados por el virus de EEV bajo tratamiento combinado con MLT, MIN y AA.

En lo que se refiere a las concentraciones MDA en homogeneizados de cerebro en los ensayos combinados al 1^{er} día p.i se observó aumento significativo ($p < 0,001$) en el grupo de ratones infectados (EEV: $483,20 \pm 2,39$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína

con respecto al grupo control (Control: $399,80 \pm 5,15$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína, a los no infectado tratados con MLT y MIN (MLT+MIN: $253,90 \pm 3,87$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y MIN y AA (MIN+AA: $374,10 \pm 5,86$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) y al tratado con MIN y AA infectado (EEV+MIN+AA: $319,60 \pm 1,96$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína).

En los grupos no infectados tratados con MLT y MIN (MLT+MIN) y con MIN y AA (MIN+AA) y el infectado tratado con la combinación MIN y AA (EEV+MIN+AA) existió disminución significativa ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos. Por su parte, el grupo infectado y tratado con MLT y MIN (EEV+MLT+MIN: $488,30 \pm 2,86$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) objetivó aumento significativo ($p < 0,001$) en relación al control, a los grupos no infectados tratados con MLT y MIN (MLT+MIN), con MIN y AA (MIN+AA) y al grupo infectado con la combinación MIN y AA (EEV+MIN+AA).

Para el 3^{er} día p.i. el grupo infectado (EEV: $518,60 \pm 2,28$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) presentó aumento significativo ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos (Control: $406,10 \pm 5,36$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; MLT+MIN: $370,90 \pm 2,44$ $\mu\text{M}/\text{mg}$, EEV+MLT+MIN: $283,80 \pm 4,15$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína; MIN+AA: $205,80 \pm 4,47$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína y EEV+MIN+AA: $316,80 \pm 1,65$ $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína), al igual como se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los grupos no infectados tratados con las combinaciones de MLT y MIN (MLT+MIN), MIN y AA (MIN+AA), los infectados tratados con MLT y MIN (EEV+MLT+MIN) y MIN y AA (EEV+MIN+AA) en comparación con el resto de los grupos estudiados.

En referencia al 5^{to} día p.i. con respecto al grupo infectado (EEV: 491,00±5,60 μ M/mg de proteína) se observó aumento significativo ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos (Control: 335,10±15,12 μ M/mg de proteína; MLT+MIN: 105,50±3,34 μ M/mg de proteína; EEV+MLT+MIN: 115,90±4,98 μ M/mg; MIN+AA: 359,70±4,25 μ M/mg de proteína y EEV+MIN+AA: 283,60±4,59 μ M/mg de proteína de proteína). A su vez, el grupo no infectado tratado con la combinación MLT y MIN (MLT+MIN) y el grupo infectado tratado con MLT y MIN (EEV+MLT+MIN) presentaron una disminución significativa ($p < 0,01$) con respecto al control, al infectado (EEV), al grupo no infectado tratado con MIN y AA (MIN+AA) y al infectado y tratado con MIN y AA (EEV+MIN+AA) (Figura 16).

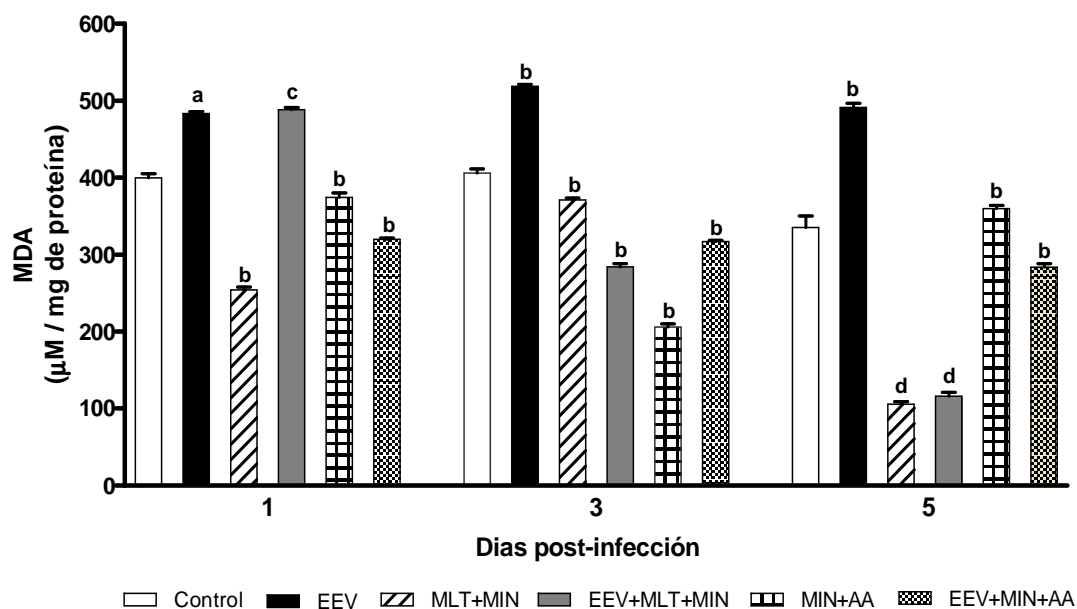


Figura 16. Concentraciones de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV bajo tratamientos combinados con MLT, MIN y AA. La concentración se determinó por el ensayo de ácido tiobarbiturico en el suero de ratones infectados ($n=5/\text{grupo}/\text{ensayo}$). Los datos representan $X \pm \text{DE}$. La significancia fue determinada con ANOVA y el post test de Bonferroni. ^a $p < 0,001$ vs control; MLT+MIN; MIN+AA y EEV+MIN+AA. ^b $p < 0,001$ vs resto de los grupos. ^c $p < 0,001$ vs control; MLT+MIN; MIN+AA y EEV+MIN+AA. ^d $p < 0,01$ vs control; EEV; MIN+AA y EEV+MIN+AA.

V. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos avanzado en el desarrollo de estrategias terapéuticas en la EEV que constituye un problema de Salud Pública en algunas regiones de Sur América, incluyendo Venezuela. Hemos demostrado que el empleo preventivo de la combinación MLT y MIN es el que posee el mayor efecto terapéutico sobre la infección por EEV en el sistema celular *in vitro* y en el modelo experimental murino *in vivo*. Por lo tanto se sugiere que la administración de MLT y MIN constituye una opción terapéutica para esta dramática enfermedad infecciosa y nuestros hallazgos contribuyen a establecer un racional para su potencial desarrollo clínico. En la discusión vamos a seguir un orden de presentación similar al establecido en los resultados.

Con la finalidad de investigar de forma comparativa las diferentes dosis de MLT, MIN y AA y establecer la concentración óptima en el estudio *in vitro* en cultivos celulares de neuroblastoma murino infectados con el virus de EEV, en el presente estudio se mantuvo un esquema de administración preventiva de dichos antioxidantes, el cual ha sido desarrollado por nuestro grupo previamente (Bonilla et al., 1997; 2001).

El descenso en los títulos virales en cultivo celulares infectados por el virus de EEV bajo tratamiento individual con MLT, MIN y AA fue mas evidente en las dosis de menor concentración de cada uno de los antioxidantes a diferencia de los títulos de infectividad viral observados en las dosis de concentración intermedia y mayor. De estos resultados se puede inferir que la administración preventiva de los

componentes antes de la infección de EEV consigue efectos beneficiosos con la dosis de menor administración en términos terapéuticos, y desde una perspectiva de potencial práctico nuestros hallazgos confieren el racional para realizar un ensayo clínico con tratamiento de MLT y MIN en personas que vayan a exponerse a un entorno epidemiológico de riesgo. El análisis del efecto de estos antioxidantes bajo tratamiento combinado sobre la replicación viral en cultivos de células de neuroblastoma murino infectados con EEV demostró una disminución significativa en relación al tratamiento combinado de MIN y AA y MLT y AA.

Estos acontecimientos evidencian que la MLT es capaz de disminuir significativamente los títulos virales. El efecto protector en los cultivos celulares ante el virus de la EEV, pudiera ser explicado por su propiedad inmunoestimuladora sobre la síntesis de IFN- γ , IL-2, IL1- β y TNF- α . La producción temprana del IFN- γ por la MLT, observada por **Valero et al., (2006)** sugiere que el tratamiento previo con esta indolamina incrementa la función antiviral del IFN- γ , hecho que pudiera ocurrir justo antes de la infección viral y consecuentemente, aumentar la posibilidad de reducir la replicación viral y el daño tisular causado por el virus, por ello el descenso en los títulos virales tratados con MLT sigue esta suposición.

Por otro lado, al determinar la producción de NO en cultivos celulares de neuroblastoma murino infectados con EEV bajo tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA a concentración menor, intermedia y mayor, se encontró en la presente investigación que la dosis óptima fue la inferior de estos antioxidantes puesto que la

infección incremento los niveles de NO y al recibir esta dosificación se encontró una disminución de NO en esos cultivos.

De esta forma, el efecto antioxidante de la MLT en la producción de NO durante la infección por el virus de la EEV fue observado *in vitro* en el sistema celular de neuroblastoma múrido. En los estudios realizados en los sobrenadantes de estos cultivos, se apreció aumento de NO en los cultivos infectados y disminución de su concentración cuando las células fueron tratadas con MLT a diferentes dosis, siendo la de menor concentración la ideal. La consecuente peroxidación lipídica, observada en los cultivos infectados, fue disminuida por la MLT; no obstante, el efecto de la acción terapéutica es independiente.

Se sugiere que las ROS 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 múridos, 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).

La reducción significativa del crecimiento del virus en cultivos celulares susceptibles al mismo, contrastan con aquellos obtenidos por **Ben-Nathan et al., (1995)**, quienes no demostraron efecto alguno de la hormona sobre el crecimiento de SFV, *in vitro*. Nuestros resultados, sin embargo; no eliminan la posibilidad de que la MLT ejerza una influencia positiva sobre la resistencia del huésped, a través de un efecto inmunoestimulador periférico, más que sobre la replicación viral.

La MLT por ser una hormona lipofílica puede cruzar rápidamente la 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 (**Skrzdelewska, 2001; Wolfier, 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 et al., 2004**).

Así mismo la MIN inhibe la apoptosis inducida por el virus West Nile en células neuronales de cerebro humano, reprimiendo la activación de la JNK y redujo

significativamente los títulos virales (Michaelis et al; 2007), así como inhibe también la actividad de complejos enzimáticos generadores de ROS como xantina-xantina oxidasa y NADPH oxidasa (Choi et al., 2005).

Por otra parte, la MIN presenta un efecto antioxidante indirecto al ser capaz de inhibir el nivel de expresión de las enzimas generadoras de ROS como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la iNOS (Chao y Allen, 1992., Chabot et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que no modifica los niveles de expresión de dos de los principales sistemas antioxidantes utilizados por las células para bloquear la sobreproducción de ROS como son el glutatión y el NADPH, los cuales están disminuidos en distintos trastornos neurodegenerativos (Jordán et al., 2006).

En estudios realizados el efecto protector de la MIN se asoció con reducción de la activación de la iNOS inducible y la IL-1 β -enzima de conversión, que se expresa principalmente en la microglía. El tratamiento con 20 nM de minociclina comenzó 30 minutos antes de la exposición a NMDA, siendo esta capaz de evitar la muerte neuronal; inducida por un aumento en la producción de NO (Tiina y Koistinaho; 2001).

Los efectos citoprotectores de la MIN también han sido atribuidos a su capacidad de bloquear la actividad de algunas proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Las MAPKs, entre las que se incluye la p38 MAPK están normalmente en un estado inactivo y se activan cuando son fosforiladas por otras

cinastas. Se ha postulado que p38 MAPK interviene en distintas respuestas inflamatorias en células diversas, entre las que se incluye la microglia. Diversos estudios han demostrado que inhibidores específicos de la p38 MAPK tienen propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras. Así pues la inhibición de lap38 MAPK podría resultar beneficiosa en procesos en los que esté involucrado un proceso inflamatorio por activación microglial. En este sentido cabe destacar que la MIN bloquea la activación de p38 MAPK observada tras diferentes estímulos con NO, glutamato o NMDA (Tiina y Koistinaho; 2001).

También se ha demostrado que la MIN previene la muerte neuronal debido a su propiedad de bloquear el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PTP) y el hinchamiento mitocondrial producido por calcio (Fernández et al., 2006; Wang et al., 2004). Dicho efecto podría explicarse por la disminución del potencial de membrana mitocondrial que produce la MIN lo que prevendría el acumulo tóxico de calcio y la consiguiente formación del PTP (Fernández et al., 2006).

En estudios realizados en cultivos celulares, se determinó que la MIN bloquea la acción de poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), enzima que desencadena la inflamación y la muerte celular. La MIN se ha mostrado como un excelente inhibidor de la PARP-1, mejor incluso que los inhibidores conocidos. Según los investigadores, hay que tener en cuenta dos observaciones previas, la primera es que la PARP-1 se activa siempre que existe daño en el ADN; en función de la naturaleza y el grado de ese daño, la PARP-1 puede desencadenar o bien la reparación del ADN, una

respuesta inflamatoria o apoptosis celular. La segunda observación se realizó hace diez años por Tiina M.K. cuando encontró que la MIN prevenía la inflamación y la apoptosis en cultivos (Sánchez et al., 2006).

Del mismo modo, se han reportados ensayos sobre el efecto neuroprotector e inhibidor de la MIN sobre la NOS. El tratamiento con MIN inhibe la expresión del iNOS *in vivo* y bloquea potentemente la neurotoxicidad del iNOS *in vitro*. Así, la inhibición directa y/o indirecta de la neurotoxicidad mediada por el NO podría explicarse por las propiedades neuroprotectoras de la MIN (Yansheng et al., 2001; Sang et al., 2004). Igualmente, este antibiótico se ha utilizado en ratones con gran aceptación debido a su seguridad y a su habilidad para penetrar la BHE (Zhu et al., 2002). Por ello, en esta investigación observamos que el tratamiento preventivo con MLT y MIN tanto en sobre la producción de NO en la infección viral por EEV en el modelo experimental *in vivo* y en un sistema celular *in vitro* fue la más eficaz.

En referencia al contenido celular de MDA, se mantuvo disminuido en mayor relevancia con la dosis de menor concentración tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*. Estos datos sugieren que la MLT disminuyó tanto la producción de NO como la concentración de MDA, donde la combinación del tratamiento preventivo con MLT y MIN fueron similares en cuanto a su descenso, ya que en ambas condiciones descendía la acción del virus de la EEV, el cual es altamente citopático.

En estudios realizados el AA y el sulfato de cobre fueron utilizados en células VERO infectadas con el virus de la rabia, en donde el virus fue completamente inactivado después de 72 horas. Estos hallazgos sugieren que el AA puede ser utilizado como un agente de inactivación del virus de la rabia en cultivos celulares (Madhusudana et al., 2004). Este hecho se relaciona con los observados en nuestro estudio ya que se encontraron a su vez disminución tanto en los títulos virales como en las concentraciones de NO y MDA en los ensayos *in vitro*.

El tratamiento previo de las células con AA atenuó la producción de ROS la fosforilación de p38 MAPK y la activación de la JNK1, la adición de AA bloqueo casi completamente la fosforilación de p38 MAPK, lo que sugiere la participación de ROS en la fosforilación de esta quinasa. Así, la producción de ROS proporciona una señal para la fosforilación selectiva de la p38 MAPK y la inducción de la apoptosis en cultivo de células de glioblastoma humano (Arabinda et al., 2007).

Por otra parte, en el presente estudio se demuestra que el tratamiento preventivo combinado con MLT y MIN es el que posee el mayor efecto terapéutico sobre la infección por EEV en ratones. Este hecho se hace evidente al evaluar que al sexto día p.i. la tasa de supervivencia fue reducida del 100% a un 75%. Por lo tanto se sugiere que la administración de MLT y MIN constituye una opción terapéutica para esta dramática enfermedad infecciosa y nuestros hallazgos contribuyen a establecer un protocolo racional para su potencial desarrollo clínico. En el desarrollo de la discusión vamos a seguir un orden similar al establecido en los 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 (500 µg/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%. En la presente investigación los ratones inoculados con el virus de la EEV, se encontró que después de la inyección de una dosis similar de MLT, la sobrevivencia descendió de 100% a 75%. Se sugiere un efecto directo y/o basado en la estimulación de células inmunocompetentes, de la MLT sobre la replicación del virus de EEV en el Sistema Nervioso Central, porque en el día 5 p.i., no pudimos detectar el virus en el cerebro de los ratones infectados tratados con la hormona.

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 la presente investigación hemos estudiado la modalidad de administración terapéutica preventiva de MLT, MIN y AA a ratones infectados con el virus de EEV, manteniéndose el esquema de administración preventivo, observando que en estas condiciones experimentales la sobrevida fue de un 75%. Por lo tanto, y atendiéndonos a los resultados obtenidos en otras formas de administración experimental, no es pertinente concluir la ausencia del valor terapéutico de la administración de MLT, MIN y AA ante la infección natural del virus y en condiciones experimentales sub letales.

La modalidad de administración preventiva consigue reducción de la moratlidad al 7^{mo} día de seguimiento. De forma interesante esta modalidad de tratamiento en este modelo de infección letal consigue mantener un porcentaje significativo de supervivencia de 45% de los animales a los 10 días de seguimiento, así como también ocurre en el tratamiento combinado con MIN y MLT donde al 7^{mo} día el porcentaje de supervivencia fue de un 60%. De estos resultados puede inferirse que la administración preventiva consigue efectos beneficiosos en términos terapéuticos. Desde una perspectiva de potencial práctico nuestros hallazgos confieren el racional para realizar un ensayo clínico con tratamiento con MLT y MIN en personas que vayan a exponerse a un entorno epidemiológico de riesgo del virus.

En el caso de la MLT, este efecto beneficioso sobre la supervivencia a la infección por EEV en animales experimentales, puede explicarse por dos 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.

En el presente trabajo se demuestra un incremento de los títulos virales en los homogeneizados cerebrales de los animales infectados con el virus de EEV; dichos títulos fueron incrementando sus niveles a medida que transcurrían los días post-infección al compararlos con los animales tratados con MLT, MIN, AA, MIN y MLT y MIN y AA cuyo incremento fue inferior a los de los no tratados, lo cual evidencia que estos compuestos son capaces de disminuir significativamente los títulos virales en el cerebro de ratones infectados, efecto que en el caso del AA no fue tan notable.

El descenso en los títulos virales en el cerebro de los ratones infectados tratados con MLT y MIN indican la eficacia con este tratamiento preventivo. Adicionalmente, nuestros resultados parecen indicar que la infección causada por el virus de la EEV activa la producción de ciertas citocinas; de hecho, **Martz y Howell (1989)** han postulado la existencia de un mecanismo de inactivación celular dependiente de citocina, de virus como el Herpes simple. Este mecanismo debería

ser profundizado e incluido en el análisis de activación, por MLT, de factores solubles (TNF- α , anticuerpos neutralizantes, etc.), que son considerados importantes para el control de infecciones producidas por virus citopáticos (Morrey et al., 1994; Ozmen et al., 1995).

Las propiedades inmunoestimuladoras de la MLT se han hecho evidentes en ratones inmunizados con la cepa vacunal TC-83 del virus de la EEV. Los títulos séricos de IgM antiEEV fueron significativamente altos al compararlos con los controles inmunizados no tratados con MLT, lo que nos sugiere que el tratamiento con MLT, aumenta la eficiencia de la inmunización contra el virus de EEV en ratones (Negrette et al., 2001).

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran un aumento en la producción de NO en el tejido cerebral y el suero de animales infectados con el virus de la EEV, que fue disminuido por el tratamiento preventivo con MLT y MIN. Estos hallazgos fueron muy similares a los encontrados *in vitro* y sugieren que una de las células probablemente afectadas por la infección y el tratamiento con MLT en ratones, fueron las neurona, 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).

Ademas, el virus de la EEV es capaz de aumentar el metabolismo oxidativo nitrogenado en el cerebro durante la infección y que la MLT puede contrarrestar este

efecto. El aumento del NO pudo haber inducido daño cerebral como lo revela el aumento de los niveles de peroxidación lipídica en los animales infectados por el virus al quinto día de estudio, que de igual manera fueron significativamente disminuidos por el tratamiento con MLT.

El efecto dual de disminución de la producción de NO y de la lipoperoxidación sugiere que el NO estaría actuando como elemento oxidante durante la infección por el virus de la EEV. A este respecto, se ha reportado la capacidad del NO para inducir lipoperoxidación (Horton, 2003); además, la inducción de estrés oxidativo cerebral por el virus de la EEV, ha sido previamente reportado por **Schoneboom et al., (2000)**, quienes determinaron que el virus de la EEV es capaz de inducir la expresión de genes de la iNOS y del NO como un mecanismo de degeneración de neuronas y astrogliá. Estos autores refieren a la neurodegeneración como apoptosis, lo que pudiese estar relacionado con el incremento de la lipoperoxidación encontrada en este estudio.

El efecto inductor del NO por el virus de la EEV, parece ser un mecanismo de patogénesis usado por otros virus. **Valero et al., (2002)** encontraron aumento en la producción de NO en pacientes con Dengue, el cual es capaz de expresar la iNOS en monocitos humanos (**Nevez-Souza et al., 2005**). Así mismo, se ha reportado incremento sostenido de la producción de NO como estrategia de defensa ante las infecciones causadas por los virus de Encefalitis Japonesa e Influenza (**Lin et al., 1997**). Sin embargo, el papel de NO en cuanto a su efecto sobre el ciclo viral parece

controversial, dado que la producción de NO puede ser activada de forma específica por algunos virus como el de la EEV, relacionándose elevadas concentraciones con la severidad de la infección (Bonilla et al., 2004); pero suprime la replicación del virus dengue (Charnsilpa et al., 2005).

La MLT es una hormona con capacidad antioxidante que 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 et al., 1999; Bonilla et al., 2001; Medina 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 capturar el NO (Bonilla et al., 2004; Chang et al., 2005; Killic et al., 2005). Si bien en el presente estudio se administró MLT, no podemos descartar el papel de la MLT endógena, debido a que reportes previos han demostrado que la luz intensa puede aumentar las concentraciones de MLT en el bulbo olfatorio (una de las principales vías de infección del virus de la EEV) de ratones infectados por este virus (Medina et al., 2001).

Cabe destacar que el efecto de la MLT sobre la peroxidación lipídica puede ser más amplio que el bloqueo del sistema del NO. La MLT tiene un poder antioxidante ampliamente demostrado (Reiter, 2000; Kerman et al., 2005; Tomás-Zapico y

Coto-Montes, 2005) y que además puede actuar sobre la producción o el bloqueo de otras ROS a través de su efecto sobre la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión reducido, modificándolos para disminuir el estrés oxidativo y la lipoperoxidación (**Ara et al., 2005**).

Por su parte, la MIN posee la capacidad de difundirse en el SNC a niveles clínicamente eficaces. Aparte de sus propiedades antimicrobiales, la MIN se ha encontrado tener efectos beneficiosos en la inflamación, activación microglial, metaloproteinasas de matriz, producción de NO, y la muerte celular apoptótica. En la MIN, se ha encontrado tener efectos neuroprotectores en modelos animales en varias enfermedades incluyendo infarto, esclerosis en placas y enfermedad de Parkinson. La seguridad probada de la MIN durante décadas de uso como un antibiótico sugiere que puede tener el potencial para el desarrollo en un tratamiento eficaz de múltiples condiciones neurológicas en los humanos (**Zemke et al., 2004**).

Estudios han demostrado como la MIN, media la neuroprotección en los modelos experimentales de neurodegeneración. Inhibe la actividad de caspasa-1, caspasa-3, induce la formación de iNOS y p38 mitogeno-activado proteínquinasa. Aunque la MIN no inhibe estas enzimas directamente, los efectos pueden ser el resultado de la interferencia con mecanismos que producen su activación secundaria (**Zhu et al., 2002**).

Debido a que los factores antes dichos son importantes en la esclerosis amiotrófica lateral (ALS), se ha probado la MIN en ratones con ALS. Obteniéndose que la MIN, retarda el ataque de la enfermedad y extiende la supervivencia en los ratones con ALS. La MIN inhibe la permeabilidad-transición mitocondrial mediando la liberación de citocromo c. La MIN inhibe la liberación de citocromo c demostrándose *in vivo*, en las células y en mitocondria aislada. Debido a la seguridad de la MIN, y su habilidad de penetrar la BHE, esta droga puede ser una nueva terapia para ALS (Zhu et al., 2002). Por ello, al combinar el tratamiento con la MLT aumento su acción ya que se produjo en el presente estudio un porcentaje significativo de supervencia al día 6 de un 75% mientras que para el día 7 un 60%.

El mecanismo molecular de acción del AA lo sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxido, o de nitrosaminas durante la digestión (Epperly et al., 2004). Es capaz de reducir los radicales fenoxilo formados durante la actividad vitamínica E, restableciéndola (Chao et al., 2002). Por otra parte, se ha observado un incremento en la producción de NO y MDA en el tejido cerebral y el suero de ratones infectados con el virus de EEV, que disminuye por el tratamiento con MLT y AA de una manera individual y particular. Con el tratamiento con MIN no se observó un descenso significativo de NO pero si de MDA en homogeneizados cerebrales de ratones infectados. Valero (2008) sugiere que el tratamiento previo con MLT incrementa la función antiviral del IFN- γ , hecho que pudiera ocurrir justo antes de la infección viral y consecuentemente, aumentar la posibilidad de reducir la replicación viral y el daño tisular causado por el virus. El

descenso en los títulos virales en cerebro de los ratones infectados tratados con MLT sigue esta suposición. Con el tratamiento combinado de MIN y MLT y MIN y AA se evidenció una caída constante en la producción de NO y MDA tanto en suero como en tejido cerebral de ratones infectados con el virus. Estos hallazgos sugieren que el virus de la EEV es capaz de aumentar el metabolismo oxidativo nitrogenado en el cerebro durante la infección y que los tratamientos evaluados puede contrarrestar este efecto.

El efecto dual de disminución de la producción de NO y de la lipoperoxidación sugiere que el NO estaría actuando como elemento oxidante durante la infección por el virus de la EEV. Al respecto, se ha reportado la capacidad del NO para inducir lipoperoxidación (**Horton, 2003**); igualmente, la inducción de estrés oxidativo cerebral por el virus de la EEV, ha sido previamente reportado por **Schoneboom et al., (2000)** quienes determinaron que el virus de la EEV es capaz de inducir la expresión de genes de la iNOS y del NO como un mecanismo de degeneración de neuronas y astrogliá. Estos autores refieren a la neurodegeneración como apoptosis, que parece ser responsable del incremento de la lipoperoxidación encontrada en este estudio.

El efecto inductor sobre la producción de NO por el virus de la EEV, parece ser un mecanismo de patogénesis que usan otros virus. **Valero et al., (2002)** encontraron un aumento en la producción de NO en pacientes con Dengue; este virus es capaz de expresar la iNOS en monocitos humanos (**Nevez-Souza et al., 2005**).

Así mismo, se ha reportado un incremento sostenido de la producción de NO como estrategia de defensa ante las infecciones causadas por los virus de Encefalitis Japonesa e Influenza (Lin et al., 1997; Rimmelzwaan et al., 1999); Sin embargo, el papel del NO sobre el ciclo viral parece controversial, dado que la producción de NO puede ser activada de forma específica por algunos virus como el de la EEV, relacionándose las elevadas concentraciones con la severidad de la infección (Ondine et al., 2001; Bonilla et al., 2004); pero el NO suprime la replicación del virus dengue (Charnsilpa et al., 2005).

En los tejidos cerebrales se evidenció un incremento de NO y MDA en los animales infectados que fue disminuido por los tratamientos individuales con excepción de la MIN que produjo un aumento para los días 3 y 5 p.i. Así mismo, ocurrió en los ensayos de Sang et al., (2004), en animales infectados y en cultivo de células gliales y neuronas; notaron que la MIN redujo la apoptosis vía disminución de la expresión de la iNOS y la peroxidación lipídica dentro de las células gliales pero no en las neuronas, concluyendo que el efecto neuroprotector de la MIN está relacionado con la inhibición de iNOS y la producción de NO en células gliales.

Igualmente en un estudio realizado por Sarah et al., (2008) buscaba probar el efecto neuroprotector de la MIN, en ratones neonatales contra los reovirus neurotrópicos, comprobaron que la MIN no previene ni el inicio, ni el progreso fatal de la encefalitis, pero retarda perceptiblemente la muertes de los ratones,

sugiriendo que el tratamiento con MIN puede proporcionar una terapia adjunta en las infecciones virales del SNC.

La caída en 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; Killic et al., 2005). Resultados similares, se han reportado en un modelo de abrasión del cuello uterino en ratones, donde el tratamiento con MLT redujo los niveles tisulares de NO y la peroxidación lipídica (Ara et al., 2005).

De igual manera, recientemente en un estudio, usando los homogeneizados de cerebro de ratas, se investigó los efectos del MLT y del pinoline en la prevención del nivel de contenido de la peroxidación (LPO) y del carbonilo del lípido en las proteínas inducidas por el NO, resultando que ambos redujeron los niveles a partir de la 0.03 a 3 milímetros y de 1 a 300 μ M, respectivamente. Bajo condiciones *in vitro* de este experimento, ambos antioxidantes eran más eficientes (PinoI., 2006).

Los hallazgos en el suero pueden representar un reflejo de la infección en el SNC con ciertas variaciones. Se encontró aumento en los contenidos de NO y MDA sérico durante todos los días p.i., los cuales disminuyeron con la administración de la MLT a partir del primer día y AA desde el tercero; sin embargo, eso no ocurrió con la MIN, donde se observó que no ocurrió una disminución de los niveles de NO durante el ensayo y si hubo disminución del MDA sólo al quinto día. Esto sugiere que siendo

el NO una sustancia más difundible, este pudo pasar a la circulación en los animales infectados y disminuir su concentración cuando disminuye su producción en el cerebro por efecto de los tratamientos. En el caso de la peroxidación lipídica, los productos generados tienden a acumularse en el tejido y sus alrededores y por ende es poco probable que pasen en mayor cuantía a la circulación periférica (Espina., 2005).

Probablemente el mecanismo regulador de la producción de NO durante la infección del SNC por el virus de la EEV sea más complejo y aunque se ha establecido en investigaciones anteriores que la MLT presenta una gran habilidad para neutralizar estos radicales, contribuyendo a disminuir el daño oxidativo en el SNC, el porcentaje de interacción de ella con los radicales OH aún no está establecido (Reiter et al., 2001); pero en investigaciones recientes se ha demostrado que reduce la producción del NO, del iNOS y la peroxidación lipídica en cultivos celulares y en cerebro de ratones infectados con EEV, abriendo un compás de interrogantes sobre el efecto y rol de este potente antioxidante durante esta infección viral (Valero et al., 2006).

Algunos estudios refieren la actividad antioxidante del AA, pero es poco lo que se sabe de su efecto y su mecanismo de acción. Estos fármacos solo han sido observados de manera individual y se han reportado estudios sobre sus capacidades terapéuticas en otras enfermedades virales tales como la gripe común, hepatitis C, rabia, SARS, rinotraqueitis y SIDA (Gronbaek K., 2005; Madhusudana, 2006).

Con respecto al tratamiento combinado, se evidenció en los tejidos cerebrales un incremento de las concentraciones de NO y MDA en los animales infectados las cuales disminuyeron con los tratamientos combinados de MIN y AA (EEV+MIN+AA) y de MLT y MLT (EEV+MLT+MIN) efecto que se manifestó a partir del tercer día p.i., ocurriendo lo mismo con los animales controles sometidos a dichos tratamientos pero a partir del primer día post-infección, lo que nos hace pensar que a pesar que la MIN en este ensayo no se apreció como un antioxidante efectivo, al combinarse con otros antioxidantes ocurre un aumento potencial de importancia significativa.

Los hallazgos obtenidos a nivel sérico nos revelan cierta similitud a los descubrimientos obtenidos en los homogeneizados cerebrales con la salvedad que ambos tratamientos evidenciaron un aumento al quinto día p.i. tanto de NO como de MDA en los ratones infectados, por lo que podemos sugerir que este efecto no resultó está relacionado al tiempo de exposición.

Los niveles de NO y MDA disminuyeron también con el tratamiento combinado bajo condiciones de no infección, a pesar que en el tejido cerebral se indujo un aumento en la producción de MDA al tercer día p.i. con la combinación MLT y MIN; esto sugiere que la biología del metabolismo oxidativo cerebral en estado normal, puede diferir de la encontrada durante la infección con el virus de la EEV (Valero et al., 2002; Bonilla et al., 2004; Kilic et al., 2005) y por ende tanto la MLT como la MIN pueden tener efectos moduladores diferentes.

Finalmente se evidenció el efecto sinérgico que posee la MIN, que al combinarse con los otros antioxidantes estudiados, presentó una acción protectora contra el estrés oxidativo y que el efecto neuroprotector de la MIN está relacionado con la inhibición de iNOS y la producción de NO en células gliales como lo demostraron **Sang et al.**, en un estudio realizado en el 2004.

Tomando en cuenta todos los hallazgos de este estudio se observó que el efecto protector de la MLT, MIN y AA durante la infección con el virus de la EEV *in vitro e in vivo*, puede deberse a un mecanismo antioxidante mediado por la producción de NO y la peroxidación lipídica. Se requieren nuevos estudios para definir los mecanismos íntimos que le permiten a la MLT, MIN y AA 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 etáreos. 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.

Nuestros resultados indican que el empleo preventivo de MLT ó ligeramente superior de la combinación de MLT con MIN constituyen un tratamiento preventivo

que disminuye la mortalidad inducida por la infección por EEV en el modelo murino con control de diferentes parámetros biológicos potencialmente implicados en su patogenia.

La seguridad observada en los tratamientos de MLT y su bajo coste permiten considerar que el empleo preventivo de esta molécula en poblaciones de riesgo de contraer la infección por EEV puede constituir una eficaz medida terapéutica. Futuros trabajos de investigación clínica deberán contestar la certeza de esta hipótesis. Nuestros resultados constituyen un racional para su realización.

VI. CONCLUSIONES

Del estudio del efecto del tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA sobre la replicación viral y la producción de NO y MDA en la infección por EEV en un sistema celular *in vitro* y en el modelo experimental murino *in vivo* se concluye que:

1. El tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA disminuye en el modelo experimental *in vitro* de infección por EEV los títulos virales en los cultivos celulares y en el homogeneizado cerebral y suero del modelo murino *in vivo* de infección por EEV, siendo la combinación MLT y MIN la mas eficaz.

2. El tratamiento preventivo con MLT y AA pero no con MIN, provocó una disminución en la producción de NO y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (MDA) en modelos experimentales de la infección por EEV *in vitro* e *in vivo*, siendo la combinación MLT y MIN la mas eficaz.

3. El tratamiento preventivo con MLT, MIN y AA disminuye la mortalidad inducida por inoculación de dosis letales del virus en un modelo experimental murino, siendo la combinación MLT y MIN la mas eficaz.

4. Tomados globalmente estos resultados apoyan el desarrollo de estrategias terapéuticas preventivas de la infección por EEV, siendo la MLT el candidato preferente por su elevada tolerancia. El patrón de alteración de las citoquinas pro-inflamatoria y moléculas anti-inflamatorias es diferente en las infecciones primarias y secundarias asociandose éstas a las formas clínicas mas graves.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai, S. Citoquinas en: ***Inmunología celular y molecular***. Elsevier. 267-301, 2009.
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. Allegra M., Reiter R.J., Tan D., Gentile C., Tesoriere L., Livrea M. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. ***J. Pineal Res.*** 34(1):1-10, 2003.
4. Ananth C., Gopalakrishnakone and Kaur C. Protective role of melatonin in Domoic Acid- Induced Neuronal damage in the hippocampus of adult rats. ***Hippocampus.*** 13(2):375-387, 2003.
5. Angeli A., Gatti G., Sartori M.L., 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.*** 8(3):145-157, 1988.
6. Appay, V. T-cell based vaccines: where are we?. ***Expert Rev Anti Infect Ther.*** 2(4): 463-465, 2004.
7. Ara C., Kirimlioglu H., Karabulut A.B., 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):1341-1350, 2005.
8. Arabinda Das., Naren L., Swapan K. Garlic Compounds Generate Reactive Oxygen Species Leading to Activation of Stress Kinases and Cysteine Proteases for Apoptosis in Human Glioblastoma T98G and U87MG Cells. Department of Neurosciences, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina. 1083-1095, 2007.
9. 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.
10. Atre D., Blumenthal E.J., Melatonin: immune Modulation of spleen cell in young, middle-aged and senescent mice. ***Mech Ageing Dev.*** 103(3): 255-268, 1998.
11. Avik R., Arundhati J., Kavitha Y., Matthew B., Fung Y., Martinson J., Kalipada, P. Reactive oxygen species up-regulate CD11b in microglia via nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. ***Free Radical Biology & Medicine.*** 45(2): 686-699, 2008.
12. Avilan R. Situación actual de la Encefalitis equina Venezolana y otras arbovirosis en Venezuela. ***Gaceta Médica de Caracas.*** 104(1): 14-24, 1996.
13. Beck CE., Wyckoff RW. Venezuelan equine

- encephalomyelitis. **Science**. 88(1): 530-534, 1938.
14. Behan WM., McDonald M., Darlington, LG. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenil. **Br J Pharmacol**. 128(2): 1754-1760, 1999.
 15. Ben-Nathan D., Maestroni G J., Lusting S., Conti A. Protective effects of Melatonin in mice infected with encephalitis viruses. **Arch Virol**. 140(4): 223-230, 1995.
 16. 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.
 17. Bendich. A Physiological role of antioxidants in the immune system. Symposium: Antioxidants, immune response and animal function. **J Dairy Sci**. 76(2): 2789-2794, 1993.
 18. Benenson A. Manual para el control de las Enfermedades Transmisibles. **Publicación Científica** N° 564 O.P.S 16ta Edición 144-145, 501-512, 1997.
 19. Bergold GH., Mazzali R. Plaque formation by arbovirus. **J Gen Virol**. 2(1): 273-284, 1968.
 20. 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.
 21. Blum D., Chtarto A., Tenenbaum L., Brotchi J., Levivier M. Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. **Neurobiol Dis**. 17(3):359-366, 2004.
 22. 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(2): 207-210, 2001.
 23. Bonilla E., Valero N., Chacín-Bonilla L., Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. **J Pineal Res**. 36(2): 73-79. 2004.
 24. 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.
 25. Bonilla E., Valero-Fuenmayor N., Pons H., Bonilla-Chacín, L. Melatonin protects mice infected with Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. **Cell Mol Life Sci**. 53(3): 430-434, 1997.
 26. 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 - 2038, 1999.
27. 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.
 28. Calisher C., Shope R., Brandy W., Wrebe M. Propose antigenic classification of registered Arboviruses, Togaviridae, Alfavirus. **Intervirolgy**. 14(2): 229-323, 1980.
 29. Caroleo M.C., Frasca D., Nistico G., Doria G. Melatonin as immunomodulador in immunodeficient Mice. **Immunopharmacol**. 23(4): 81-89, 1992.
 30. 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(1):367-372, 1993.
 31. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Informe Epidemiológico sobre Encefalitis equina. Rio de Janeiro. **Panaftosa**. 12(1): 8-15, 1994.
 32. Chabot S., Yong FP., Le DM, Metz LM., Myles T., Yong VW. .La Minociclina un nuevo farmaco neuroprotector. **Cytokine**. 137(5): 993-998, 2002.
 33. Chambers HF. Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In Hardman JG, Limbird AG, eds. The pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. New York: McGraw- Hill Professional 2001. p. 1240-6.
 34. 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): 249-257, 2002.
 35. 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): 206-214, 2005.
 36. Chao JC., Yuen MD., Chen PY., Chien SW. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. **J Nut Biochem**. 13(11): 653-663, 2002.
 37. Chao PY., Allen KG. Glutathione production in copper-deficient isolated rat hepatocytes. **Free Radic Biol Med**. 12(2): 145-150, 1992.
 38. Charnsilpa W., Takhampunya R., Endy TP., Mammen MP. Jr,Libraty, D. H. & Ubol, S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. **J Med Virol**. 77(3): 89-95, 2005.

39. Chen M., Ona Vo., Li M., Ferrant RJ, Fink KB., Zhu S., Bian J., Guo, L., Farrell AA., Hersch SM., Hobbs W., Vonsattel JP., Cha J., Friedlander R. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington Disease. **Nature Medicine**. 6(2): 797 – 801, 2000.
40. Choi SH; Lee DY; Chung ES; Hong YB; Kim SU; Jin BK. Inhibition of thrombin-induced microglial activation and NADPH oxidase by minocycline protects dopaminergic neurons in the substantia nigra in vivo. **J Neurochem**. 95(1): 1755-1765, 2005.
41. Claustrat B., Brun J., Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Med Rev**. 9(1): 11-24, 2005.
42. Clemens JW., Jarzynka MJ., Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt₁ melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. **Life Sci**. 69(3): 27–35, 2001.
43. Colombo L., Chen G.J., López M.C., Watson R. Melatonin induced increase in gamma- interferon production by murine splenocytes. **Immunol Letters**. 33(4): 123-126, 1992.
44. Colovic M., Caccia S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J. Chromatogr., B Anal. Technol. Biomed.* **Life Sci**. 79(1): 337–343, 2003.
45. Croen Kd. Evidence for antiviral effect of nitric oxide Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. **J Clin Invest**. 91(6): 2446-2452, 1993.
46. 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.
47. De La Hoz F. Encefalitis Equina Venezolana. **MOVZ-Cordoba**. 5(1): 18-22, 2000.
48. 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.
49. 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(3): 730-739, 1971.
50. Dommergues M.A., Plaisant F., Verney C., Gressens P. Early microglial activation following neonatal excitotoxic brain damage in mice: a potential target for neuroprotection. **Neuroscience**. 121(5): 619– 628, 2003.
51. Doolen S., Krause DN., Dubocovich ML., Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**. 345(1): 67-69, 1998.

52. Dubocovich M.L., Markowska M. Functional MT1 and MT2 Melatonin receptors in mammals. **Endocrine**. 27(2): 101-103, 2005.
53. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes. **Trends in Pharmacological Sciences**. 16(2): 50-56, 1995.
54. Dubocovich ML. Luzindole (N-0774): A Novel Melatonin Receptor Antagonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 7(1): 902-910, 1988.
55. 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.
56. Dubocovich ML., Masana M., Lacob 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(6): 365-375, 1997.
57. El-Gendy KS., Aly NM., Mahmoud, FH., Kenawy A., El-Sebae AK. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. **Food Chem Toxicol**. 48(1): 215-221, 2010.
58. Epperly MW., Shen H., Jefferson M., Greenberger JS. *In vitro* differentiation capacity of esophageal progenitor cells with capacity for homing and repopulation of the ionizing irradiation-damaged esophagus. **In Vivo**. 18(6): 675-685, 2004.
59. Ertugrul K., Ülkan K., Russel J., Reiter C., Bassetti Dirk., M. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme. **Pineal Research**. 37(4): 247-251, 2004.
60. Espina LM (2005). Efecto de la Melatonina sobre la producción de Oxido nítrico, Malondialdehido e Interleucina-1 β en modelos experimentales de Encefalitis Equina Venezolana. Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias.
61. 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.
62. Estévez AG, Jordán J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. **Ann N Y Acad Sci**. 962(7): 207-211, 2002.
63. Fain O. Vitamin C deficiency. **Rev Med Intern**. 25(12): 872-880. 2004.
64. Fernandez Gomez, FJ; Pastor, MD; Garcia, EM; Melero R; Gou-Fábregas, M; Gómez, M.

- Pyruvate protects cerebellar granular cells from 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity by activating the Akt signaling pathway and increasing glutathione peroxidase expression. **Neurobiol Dis.** 24(5): 296-307, 2006.
65. Fernández-Gómez FJ, Gómez-Lázaro M, Pastor D, Calvo S, Aguirre N, Galindo MF, et al. Minocycline fails to protect cerebellar granular cell cultures against malonate-induced cell death. **Neurobiol Dis.** 20(3): 384-91, 2005.
66. Finnochiario 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 immunoregulatory pathway. **J Interferon Res.** 8(1): 705-716, 1988.
67. Finnochiario L., Nahmod V., Launay JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. **Biochem J.** 280(6): 727-731, 1991.
68. 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(2): 94-487, 1997.
69. Fujji S., Akaike T., Maeda H. Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. **Virology.** 256(2): 203-212, 1999.
70. Fukunaga K., Takama K., Suzuki, T. High-performance liquid chromatographic determination of plasma malondialdehyde level without a solvent extraction procedure. **Anal Biochem.** 230(1): 20-23, 1995.
71. 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(1): 685-693, 1998.
72. Golub L.M., Lee H.M., Ryan M.E., Giannobile W.V., Payne J., Sorsa, T., 1998. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple nonantimicrobial mechanisms. **Adv. Dent. Res.** 12(4): 12-26, 1998.
73. Golub L.M., Ramamurthy N.S., Llanaveras A., Ryan M.E., Lee H.M., Liu Y., Bain S. & Sorsa, T. A chemically modified nonantimicrobial tetracycline (CMT-8) inhibits gingival matrix metalloproteinases, periodontal breakdown, and extra-oral bone loss in ovariectomized rats. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 78(8): 290-310, 1999.
74. 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(1): 1331-1335, 1995.
75. Grønbaek K., Treppendahl M., Asmar F., Guldborg P. Epigenetic

- changes in cancer as potential targets for prophylaxis and maintenance therapy. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 103(5): 389-96, 2008.
76. Guerrero JM., Calvo JR., Oscuna C., López-González MA. Binding of Melatonin by lymphoid cell in humans and rodents. **Adv Pineal Res.** 7(1): 109-117, 1994.
 77. Gutiérrez AM., Reboredo GR., Catalá A. Fatty acid profiles and lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from liver, heart and brain of *Cairina moschata*. **Int J Biochem Cell Biol.** 34(6): 605-612, 2002.
 78. Halliwell B., Gutteridge. Free radicals in biology and medicine. **JMC** 3^o ed. Oxford. p 936-942, 1999.
 79. Hammom W., Sather G., Arboviruses. In diagnostic procedures for viral and rickettsial infection. **American Public Health Association.** 13(4): 227-280, 1969.
 80. 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): 1431-1440, 2001.
 81. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. **Toxicology.** 189(3): 75-88, 2003.
 82. Houston MC. Antioxidant vitamins and minerals in prevention and treatment of Hypertension. **Prog Card Dis.** 47(6): 396-449, 2005.
 83. Huang J., May JM. Ascorbic acid protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis and death induced by beta-amyloid. **Brain Res.** 1097(1): 52-58, 2006.
 84. Humbert W., Pevet P. The decrease of pineal Melatonin production with Age. **Ann NY Acad Sci.** 11(2): 43-63, 1993.
 85. Jakoky WB., Ziegler DM. The enzymes of detoxication. **J Biol Chem.** 265(3): 2715-2718, 1990.
 86. 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.
 87. Joost J., Oppenheim MD., Francis W.R. Citocinas. En: Introducción a la Inmunología Humana. **Editorial Médica Panamericana.** 5^o ed. Caracas. p 165-92, 2000.
 88. Jordán J., Aguirre N., Fernández, F., Francisca G. Minociclina y neuroprotección: luces y sombras. **Actualidad en Farmacología y Terapéutica.** 12(4): 260-263, 2006.
 89. Kerman M., Kerman B., Cirak M.F., Ozguner A., Dagtekin R., Sutcu I., Altuntas N. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress?. **Exp. Brain Res.** 163(4): 406-410, 2005.

90. 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(1): 151-155,2005.
91. Kilic E., Kilic U., Reiter RJ., Bassetti CL., Hermann DM. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. **J. Pineal Res**. 37(3): 247–325, 2005.
92. Klein T.W., Newton C., Zhu W., Daaka Y., Friedman H. Tetrahydrocannabinol, cytokines AND immunity to Legionella pneumophila. **Soc. Exp. Biol. Med**. 209(6): 205–212, 1995.
93. Kraus Kraus RI., Pasieczny R., Lariosa-Willingham K., Turner MS., Jiang A., Trauger, JW. Antioxidanpropertie of minocycline: neuroprotection in an oxidative stress assay and direct radical-scavenging activity. **J Neurochem**. 94(2): 819-827, 2005.
94. Kubes V., Ríos FA. The causative agent of infectious equine encephalomyelitis in Venezuela. **Science**. 90(1): 20-21,1939.
95. Lahiri D., Ghosh C. Interactions between Melatonin, reactive oxygen species, and nitric oxide. **Annals of the New York Academy of Science** 893(6): 325-330, 1999.
96. Lee S., Chilton E., Pak JM. Adenosine receptor blockade reduces splanchnic hyperemia in cirrhotic rats. **Hepatology**. 15(3): 1107-1111, 1992.
97. Lepage G., Muñoz G., Champagne J., Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. **Anal Biochem**. 197(2): 277-283, 1991.
98. Lin JJ., Sun YJ., Zhu DY., Osuna C., Guerrero J. Inhibicion of Japanese encephalitis virus infection by nitric oxide: antiviral effect of nitric oxide on RNA virus replication. **J. Virol**. 71(7): 5227-5235, 1997.
99. Linthicum G., Gordon S. Comparative infections of epizootic and enzootic of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in Amblyoma cajenense. **J Med. Entomol**. 295(8): 827-831, 1992.
100. 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, 18 th International Congress of Chemotherapy. 769-770, 1993.
101. 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.
102. 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(4): 97-104, 1992.
103. Lotufo CM., Lopes C., Dubocovich M.L, Farsky SH., Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *European Journal of Pharmacology.* 430(2): 351-357, 2001.
104. 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(6): 26-31, 2007.
105. Macdonald H., Nelly RG., Allen ES., Noble JF., Canjeéis LA. Pharmacokinetic studies on minocycline in man. *Clin Pharmacol Ther.* 14(2): 852-861, 2003.
106. 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): 587-595, 2002.
107. Madhusudana SN., Shamsundar R., Seetharaman S. *In vitro* inactivation of the rabies virus by ascorbic acid. *Int J Infect Dis.* 8(1): 21-25, 2006.
108. Maestroni GJ. T- helper 2 lymphocytes as peripheral target of Melatonin signaling. *J Pineal Res.* 18(3): 84-89, 1995.
109. Maestroni GJ. Therapeutic potential of Melatonin in immunodeficiency states, viral diseases and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 467(2): 217-226, 1999.
110. 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.
111. 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.
112. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiatergic mechanism. *Clin Exp Immunol.* 68(1): 384-391, 1987.
113. 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(4): 19-30, 1986.
114. 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(2): 2429-2432, 1994.
115. Maestroni, G.J. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*. 10(1): 467-476, 2001.
116. Malhotra S., Sawhney G., Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *Med Gen Med*. 6(2): 46-51, 2004.
117. Marín V. Rol y mecanismos subcelulares del óxido nítrico en la regulación de la contractilidad miocárdica. *Rev. Fed. Arg. Cardio*. 29(4): 501-507, 2000.
118. Martin MU., Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family *Biochimica et Biophysica Acta*. 1592: 265-280, 2002.
119. Martz E., Howell D. Virus control cells first and cytolytic cell second. *Immunol Today*. 10(1): 79-86, 1989.
120. 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.
121. 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.
122. Mesa D., Fabio A., Cárdenas Z., Jaime A., Villamil J. Las Encefalitis Equinas en la Salud Pública. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Departamento de Salud Animal. 2005.
123. Michaelis M., Kleinschmidt M., Doerr H., Cinatl J. Minocycline inhibits West Nile virus replication and apoptosis in human neuronal cells. *J Antimicrob Chemother*. 60(5): 981-986, 2007.
124. 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): 159-168, 1996.
125. Moncada S., Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 329(4): 2002-2012, 1993.

126. Montaña L., Chávez F. Respuesta inmune, innata y adaptativa: ¿Son los TLRs el eslabón perdido?. **Rev Fac Med UNAM.** 51(2): 60-62, 2008.
127. Morrey K., Mclachlan A., Serkin C., Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone Melatonin. **J Immunol.** 153(2): 2671-2680, 1994.
128. Morse S., Schluenderberg, T. Emerging viruses the evolution of viruses and viral diseases. **J Infect Dis.** 162(1): 1-7, 1990.
129. Murray RK. Granner DK., Rodwell M. 1993. "Bioquímica de Harper", Ed. Manual Moderno, 697-698.
130. Nava F., Calapai G. Melatonin effects on inhibition of thirst and fever induced by lipopolysaccharide in rat. **Eur J Pharmacol.** 331(3): 267-274, 1997.
131. 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.
132. Neri B., De Leonardis V., Gemelli M. T., Di Loro F., Mottola A., Ponchiatti R., Raugeri A., Cini G. Melatonin as biological response modifier in cancer patient. **Anticancer Res.** 27(2): 159-163, 1998.
133. Neves-Sousa P., Azeredo E., Zagne S., Valls-de-Souza R., Reis S., Cerqueira D., Nogueira R., Kubelka C. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expresión in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. **BMC Infectious Diseases.** 5(1): 64-68, 2005.
134. Noda Y., Mori A., Liburdy R., Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J Pineal Res.** 27(1): 159-163, 1999.
135. Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin JM. Lefoulon F., Fauchere J.L., Delagrangé P., Canet E., Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. **Journal of Biological Chemistry.** 275 (40): 31311-31317, 2000.
136. 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): 1369-1379, 2001.
137. Ozmen L., Aguet T., Trinchieri G., Garotta G. The *in vivo* antiviral activity of interleukin-12 is mediated by gamma interferon. **J Virol.** 69(3): 8147-8150, 1995.
138. P. M de Portela, "Vitaminas y Minerales en Nutrición", Ed. Lopez, 64-68, 1994.
139. 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.
140. 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.
141. Pedreañez 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.** 10(1): 1-8, 2004.
142. Perez-Flores V., Guardo Ac., Rossi Ne., Recio Ml., Reine J., Regueiro Jr. El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad. **Inmunologia.** 25(1): 50-56, 2006.
143. Pérez-Trallero E., Iglesias L. Tetraciclinas. Sulfamidas y metronidazol. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 21(9): 520-529, 2003.
144. 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): 633-639, 1999.
145. 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): 251-254, 2001.
146. 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(2): 463-468, 1993.
147. Poon AM., Liu ZM., Pang CS. Evidence for a direct action of melatonin on the immune system. **Biol Signals.** 3(1): 107-117, 1994.
148. 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(3): 430-442, 1997.
149. R.M. Melero-Fernández., E. García-Martínez., F.J. Fernández-Gómez., J.M. Hernández-Guijo., N. Aguirre., M.F. Galindo., J. Jordán. ¿Es la vieja minociclina un nuevo fármaco neuroprotector?. **Rev Neurol.** 47(1): 31-38, 2008.
150. 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(4): 190-197, 1998.
151. 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): 141-150, 2002.
152. Reed L., Muench M. A simple method of estimating fifty percent end points. **Amer J Trop Med Hyg.** 27(2): 493-497, 1938.
153. Reiter R. Functional pleiotropy of the neurohormone Melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. Abstract. Front **Neuroendocrinol.** 6(4): 383-415, 1995.
154. Reiter R. Melatonin: Lowering the High price of free radicals. **New in physiological Science.** 15(5): 246-250, 2000.
155. Reiter R.J. Melatonin Synthesis: Multiplicity of regulation. **Kynurenine and Serotonin Pathways.** Plenum press N.Y. 149-158, 1991.
156. Reiter R., Acuña-Castroviejo D., Tan D., Burkhardt, S.. Free radical-mediated molecular damage. **Annals of the New York Academy of Science.** 939(4): 200-215, 2001.
157. 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.** 92(19): 8734 -8738, 1995.
158. 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.
159. Romero F., Bosch-Morell F., Romero M., Jareno E., Romero B., Marin N., Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environ Health Perspect.** 106(5): 1229-1234. 1998.
160. 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(3): 421-425, 1988.
161. Roy A., Fung YK., Liu X., Pahan K. Up-Regulation Of Microglial Cd11b Expression By Nitric Oxide. **J Biol Chem.** 281(21): 14971-14980, 2006.
162. 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.
163. Sanchez L., Diosdad F. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. **Téc Pecu Méx.** 41(1): 49-62, 2006.
164. Sang M. Lee., Tae Y Yun., Sun J. Kim., Young C. Kim., Young J. OH., George J Markelonis., Tae H OH. Minocycline inhibits apoptotic cell death via attenuation of TNF- α expression following iNOS/NO induction by lipopolysaccharide in

- neuron/glia co-cultures. **Journal of Neurochemistry**. 91(3): 568-578, 2004.
165. Sarah M., Richardson-Quema Y., Kenneth L. Tyler. La minociclina retrasa inicio y mortalidad de la enfermedad en encefalitis del reovirus. **Acta Neurobiol Exp**. 59(1): 311-317, 2008.
166. Schäfer A., Brooke CB., Whitmore AC., Johnston RE. The role of the blood brain barrier during Venezuelan equine encephalitis virus infection. **J Virol**. 17(2): 25-31, 2011.
167. 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): 889-897, 2002.
168. Schoneboom B., Fultz M., Miller T., Mckinney L., Greider F. Astrocytes as targets for Venezuelan Equine Encephalitis virus infection. **J Neurovirol**. 5(2): 342- 354, 1999.
169. 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): 132-146, 2000.
170. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. **J Vasc Res**. 31(2):131-143,1994.
171. Seung-Yun Chung., Seol-Heui Han. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. **J Pineal Res**. 34(1): 95-102, 2003.
172. Sheld W., Arinstrong D., Hughes J. **Emerging Infections**. ASM press. Washington D.C. 27-39, 1998.
173. Sheth DS, Tajuddin NF, Druse MJ. Antioxidant neuroprotection against ethanol-induced apoptosis in HN2-5 cells. **Brain Res**. 1285:14-21, 2009.
174. Shoshkes C., Komatsu T. Does nitric oxide play a critical role in viral infections?. **J. Virol**. 72(6): 4547, 1998.
175. Skaper S., Floreani M., Ceccon M., Faccil L., Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress and the neuroprotective potential of Melatonin. **Annals of the New York Academy of Science**. 890: 107-118, 1999.
176. 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): 53-55, 2000.
177. Skrzydlewska E. Melatonin as an antioxidant. **Postepy Hig Med Dosw**. 55(6): 871-889, 2001.
178. Skwarlo-Sonta K. Funtional connections between the pineal gland and immune system. **Acta Neurobiol Exp**. 56(1): 341-357, 1996.

179. Slangenaupt 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): 355-357, 1995.
180. Smith D.L., Woodman B., Mahal A., Sathasivam K., Ghazi-Noori S., Lowden P.A., Bates G.P., Hockly E. Minocycline and doxycycline are not beneficial in a model of Huntington's disease. **Ann. Neurol**. 54: 186-196, 2003.
181. Sonnerborg A., Carlin G., Akerlund B., Jastrand C. Increased production of malondialdehyde in patients with HIV infection. **Scand J Infect Dis**. 20(1): 287-290, 1988.
182. Stankov B., Fraschini F., Reiter R. Melatonin binding sites in the central nervous system. **Brain Res Rev**. 16(3): 245-256, 1991.
183. 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: 7738-7742, 1985.
184. Sumano López HS., Ocampo Camberos L. Farmacología Veterinaria, 2da. Edición, México, McGraw – Hill Interamericana, p. 148 – 154. 1997.
185. Sung KW., Kee SH., Yoo KH., Cho EJ., Koo HH., Lee SK. Tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell rescue in patients over 1 year of age with stage 4 neuroblastoma. **Bone Marrow Transplant**. 40(1): 37-45, 2007.
186. 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(2): 212-219, 1997.
187. Thomas W.E. Brain in macrophages: evaluation of microglia and their functions. **Brain Res**. 17(1): 61-74, 1994.
188. Tiina TM., Koistinaho JE. Minocycline Provides Neuroprotection Against N-Methyl-D-aspartate Neurotoxicity by Inhibiting Microglia. **The Journal of Immunology**. 166(4): 7527-7533, 2001.
189. Tomás-Zapico C., Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes. **Journal Pineal Research**. 39(2): 99-104, 2005.
190. 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): 268-273, 2009.
191. Valero N. Arbovirus de la región. **Invest Clin**. Vol. 37(1): 1-3, 1996.
192. Valero N. (2008). Efecto inmunomodulador de la melatonina

- en modelos experimentales de la infección por el virus de Encefalitis Equina Venezolana. Universidad de Alcalá Departamento de Medicina. Unidad i+d asociada al CNB-CSIC.
193. 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.
 194. 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(2): 348-351, 2002.
 195. 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(1): 925-932, 2006.
 196. 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.
 197. Valero N. La Melatonina: ¿mito o realidad?. **Invest Clin.** 39(4): 253-255. 1998.
 198. 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.
 199. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Rev Cubana Med Milit.** 31 (2): 126-33, 2002.
 200. Von Gall C., Stehle JH., Weaver DR. Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. **Cell and Tissue Research.** 309(1):151-62, 2002.
 201. Walton T., Grayson M. Venezuelan Equine Encephalomyelitis, the Arboviruses: **Epidemiology and Ecology.** Chap 46. Vol IV. 203-233, 1988.
 202. Wang L.H., Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. **Mt Sinai J Med.** 71(6): 361-367, 2004.
 203. Weaver S., Barrett A. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews Microbiology.** 2(1): 789-801, 2004.
 204. Weawe CT., Uname ER. T cell induction of membrane Il-1 on macrofages. **Journal of Immunology.** 7(2): 320-321, 1986.

205. Witt-Enderby PA., Jarzynka MJ., Melan MA. Microtubules modulate melatonin receptor function. **Neuroscience Abstracts**. 27:142, 2001.
206. Wolfler A. Prooxidant activity of melatonin promotes fas- induced cell death in human leukemic jurkat cells. **FEBS Letters**. 502:127-131, 2001.
207. Wu DC., Jackson-Lewis V., Vila M., Tieu K., Teismann P., Vadseth C. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. **J Neurosci**. 22(3): 1763-1771, 2002.
208. Wu F., Tymi K., Wilson JX. Ascorbate inhibits iNOS expression in endotoxin- and IFN gamma-stimulated rat skeletal muscle endothelial cells. **FEBS. Lett**. 5;520(1-3): 122-126, 2002.
209. 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): 190-195, 2001.
210. Yang L., Sugama S., Chirichigno JW., Gregorio J., Lorenzi S., Shin DH. Minocycline enhances MPTP toxicity to dopaminergic neurons. **J Neurosci Res**. 74: 278-285, 2003.
211. Yansheng Du., Zhizhong MA., Suizhen Lin., Richard C. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. **PNAS**. 8(25): 14669-14674, 2001.
212. 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**. 95: 15769-74, 2008.
213. Zemke D., Majid A. The potential of minocycline for neuroprotection in human neurologic disease". **Clinical neuropharmacology**. 27(6): 293-298, 2004.
214. 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): 192-199, 2002.
215. 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): 1581-1591, 2000.
216. Zhou J., Zhang S., Zhao X., 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(2): 157-165, 2008.
217. Zhu S., Stavrovskaya I.G., Drozda M., Kim B.Y., Ona V., Li M., Sarang S., Liu A.S., Hartley D.M., Wu D.C., Gullans S., Ferrante R.J., Przedborski S., Kristal B.S.,

Friedlander R.M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. **Nature**. 417(2): 74–78, 2002.

218. Zinder S., Bredt D. Biological roles of nitric oxide. **Scientific America**. 28-35, 1992.