

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

**EFFECTO INMUNOMODULADOR DE LA MELATONINA
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA INFECCIÓN
POR EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA
VENEZOLANA**

TESIS DOCTORAL

Nereida Valero

ALCALÁ DE HENARES, 2008

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



**EFFECTO INMUNOMODULADOR DE LA MELATONINA EN MODELOS
EXPERIMENTALES DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE
ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA**

TESIS DOCTORAL

Nereida Valero

DIRECTORES DE TESIS

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

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

AGRADECIMIENTOS

- A Dios todo poderoso por guiarme en todo momento.
- A las Universidades de Alcalá y del Zulia por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.
- Al Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” forjador de conocimiento y creador de ciencia, por dejarme aportar mi granito de arena a ese cúmulo de Investigaciones de tan alta calidad científica.
- Al Dr. Ernesto Bonilla, por permitirme trabajar juntos, por que confió siempre en mí, por su trayectoria que es mi ejemplo a seguir en el campo de la Investigación y por su inmejorable calidad humana.
- Al Dr. Melchor Álvarez de Mon, por consolidar las bases para que este programa de Doctorado sea una realidad en nuestra Alma Mater, por la oportunidad brindada y la confianza que ha depositado en nuestro trabajo.
- Al Dr. Jesús Mosquera quien con su gran ayuda y conocimientos contribuyo a dilucidar gran cantidad de información generada en este trabajo, además de darme siempre su ayuda incondicional.
- Al Tec. Florencio Áñez, por haberme enseñado todo lo que se en el laboratorio que tantas horas compartimos, por su experiencia y amor, siempre con la solución en la mano y por ser parte imprescindible en mi vida personal y aunque ya no está físicamente, se que me acompaña desde donde esté.
- Al Dr. Héctor Pons por hacerme cambiar a positivo la visión de las cosas sobre todo en la dificultad, por compartir tantos conocimientos e ideas y por su paciencia y valioso tiempo en cada consulta.

- A la MgSc. Luz Marina Espina, mi mejor ayuda y apoyo en la Sección. En lo personal una gran y querida amiga.
- A la MgSc. Mery Maldonado, la gordi siempre allí cuando la necesito.
- A los Virusos, mis compañeros de trabajo y personal que labora en la sección de Virología: Yraima Larreal, Julia Arias, Alegría Levy, Jhon Bermúdez, Jennifer Gotera, Alibeth Mavarez, Jose Hernández, Eddy Meleán, Edixon Ochoa, Milagros Montiel, Anais Nery, Belkis Fuentes, Elsa Montero, que me brindaron su valiosa colaboración con mucha paciencia, esfuerzo y responsabilidad, como solo los amigos saben hacerlo.
- A mis viejos Ana y Justo y a mis hijos Ana, Jorge y Daniela por su comprensión, por ese compartir en familia que llena mi corazón, por su apoyo moral, proporcionándome ánimo en todo momento.
- A mi otro hijo Dr. Germán Añez por su cariño, consejos, apoyo e información rápida y oportuna.
- A Tía Ana por ser mi mejor soporte físico y espiritual en todo momento, no tiene precio.
- Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (LUZ-CONDES) y al Fondo Nacional De Ciencia Tecnología e Innovación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT), por el apoyo financiero.
- A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a que este trabajo se realizara.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS....

Nereida

DEDICATORIA



**A ti Floren, el amor de mi vida
A cada partecita de mí: Ana Virginia,
Jorge Eduardo y Daniela Virginia
A mis viejos Ana y Justo
A la memoria de Felicia María**

ÍNDICE

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	
Summary	
I.- Introducción	
I.1.- Agente etiológico	1
I.2.- Epidemiología	1
I.3.- Patogénesis	3
I.4.- Prevención y control	4
I.5.- Respuesta inmunitaria y mediadores oxidativos	5
I.6.- Melatonina	7
I.7.- Melatonina, receptores y antagonistas	10
I.8.- Oxido Nitrico	13
II.- Hipótesis y Objetivos	17
III.- Materiales y Métodos	
III.1.- Sistema <i>in vivo</i>	
III.1.1.- Animales	20
III.2.- Sistemas <i>in vitro</i>	
III.2.1.- Cultivo de Fibroblastos de embrión de pollo	20
III.2.2.- Cultivos de esplenocitos de ratón	20
III.2.3.- Cultivo de células de neuroblastoma múrido	22
III.3.- Virus	22
III.4.- Melatonina	22
III.4.- Dexametaxona	23
III.5.- Luzindole, Evaluación del efecto en ratones	23
III.6.- Recolección de muestras	24
III.7.- Determinación de titulo viral	26
III.8.- Determinación de citocinas	25
III.9.- Determinación de anticuerpos IgM anti-EEV	26

III.10.- Determinación de proteínas	27
III.11.- Cuantificación de óxido nítrico	27
III.12.- Determinación de MDA	28
III.13.- Análisis estadístico	28
IV.- Resultados	
IV.1.- Evaluación del efecto protector de la MLT en la infección con EEV	30
IV.2.- Evaluación del efecto de la MLT en inmunodepresión	34
IV.3.- Determinación de citocinas en suero	36
IV.4.- Determinación de TNF α y IL-1 β en homogeneizados cerebrales	40
IV.5.- Efecto de la MLT en la eficiencia de la inmunización de ratones con la cepa TC-83 del virus de la EEV	43
IV.6.- Determinación de las concentraciones de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de múridos infectados con EEV tratados o no con MLT	45
IV.7.- Determinación de las concentraciones de óxido nítrico en Suero y cerebro de ratones infectados con el virus de EEV tratados o no con MLT	46
IV.8.- Determinación de las concentraciones de Malondialdehído en Suero y cerebro de ratones infectados con el virus de EEV tratados o no con MLT	48
IV.9.- Determinación de las concentraciones de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de células de neuroblastoma múrido infectados con el virus de EEV tratados o no con MLT	49
IV.10.- Determinación de las concentraciones de óxido nítrico en cultivo de células de neuroblastoma múrido infectados con el virus de EEV tratados o no con MLT	52
IV.11.- Determinación de las concentraciones de Malondialdehido en sobrenadantes de cultivo de células de neuroblastoma	55

múrido infectados con el virus de EEV tratados o no con MLT	
IV.12.- Determinación de las concentraciones de Malondialdehido en cultivo de células de neuroblastoma múrido infectados con el virus de EEV tratados o no con MLT	58
IV.13.- Efecto antagonista del Luzindole sobre la tasa de sobrevivida y títulos virales en suero y cerebro de ratones tratados con MLT e infectados con el virus de EEV	63
V.- Discusión	72
VI.- Conclusiones	88
VII.- Bibliografía	90
VIII.- Anexos	
VIII.1.- Lista de publicaciones	100
VIII.2.- Comunicaciones enviadas a Eventos Científicos	102

ABREVIATURAS

Ácido Tiobarbitúrico (**TBA**)
Anión Hidroxilo (**•OH**)
Anión Superóxido (**O₂**)
Barrera Hematoencefálica (**BHE**)
Catalasa (**CAT**)
Complejo Principal de Histocompatibilidad (**CMH**)
Dosis Letal Cincuenta (**DL₅₀**)
Encefalitis Equina Venezolana (**EEV**)
Enzima Superóxido dismutasa (**SOD**)
Enzima Superóxido reductasa (**SOR**)
Especies de Oxígeno Reactivo (**ROS**)
Factor de Necrosis Tumoral-alfa (**TNF α**)
Fitohemaglutinina (**PHA**)
Glutación peroxidasa (**GSH-GPx**)
Glutación reductasa (**GSH-GRd**)
Interleucina-1 beta (**IL-1 β**)
Interferon gamma (**IFN γ**)
Luzindole (**L Z**)
Malondialdehído (**MDA**)
Medio Mínimo Esencial de Eagle (**MEM**)
Melatonina (**MLT**)
Nitroprusiato de Sodio (**SNP**)
Óxido Nítrico (**ON**)
Peróxido de Hidrógeno (**H₂O₂**)
Sintetasa de Óxido Nítrico (**SON**)
Sistema Nervioso Central (**SNC**)
Unidades formadoras de placa por ml (**UFP/ml**)
Encefalitis Equina del Este (**EEE**)
Encefalitis Equina del Oeste (**EEO**)

SUMMARY

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF MELATONIN ON EXPERIMENTAL MODELS OF VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS VIRAL INFECTION

The Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus has been involved in epidemic outbreaks in Venezuela and America, affecting equids and humans. Melatonin (MLT) has been shown to improve some immunodeficient status caused by viral infections. In this regard, it was proposed an evaluation of the in vivo and in vitro immunomodulatory effect of MLT on experimental VEE virus infection. In vivo assays were performed in albino NMRI mice that were pretreated with 250, 500, 1000 and 5000 μg of MLT /Kg body weight. Mice were inoculated with the Guajira strain of the virus. Serum and brain samples were extracted to determine the viral titers, gamma interferon ($\text{IFN}\gamma$), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 1beta (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor alpha ($\text{TNF}\alpha$), Interleukin 10 (IL-10), nitrite-nitrate (Nitric oxide: NO) and malondialdehyde (MDA) on days 1, 3 and 5 post viral infection (p.i.). In addition, splenocytes obtained from VEE virus infected mice untreated or treated with MLT were used to determine their proliferative status to mitogens (PHA). In vitro experiments were performed using murine neuroblastoma (Na_2) or splenocytes. In this regard, Na_2 cells or splenocytes were cocultured with VEE virus untreated and treated with MLT. Supernatants and cells from Na_2 cultures were used to determine NO, MDA and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression at 6, 12, 24, 36 and 48 hours p.i. and NO in splenocyte cultures. Luzindole was used to block MLT receptors. Cytokines and IgM antibodies against VEE virus were determined by ELISA. Viral titers were determined using chicken embryo fibroblast cultures and lymphocyte proliferation by incorporation of tritiated thymidine. NO was determined by the content of nitrite-nitrate and MDA by the thiobarbituric acid assay. iNOS expression was determined by indirect immunofluorescence. The results showed that MLT has a protective effect in mice infected with the VEE virus, retarding the beginning of the disease and extending the life of the infected mice. MLT significantly increased serum levels of $\text{IFN}\gamma$ in noninfected mice from the first to the sixth day of treatment. IL-1 β and $\text{TNF}\alpha$ increased their values from days 1 to 6 p.i. when compared to the remainder groups. No differences in IL-4 and IL-2 levels were found

in the studied groups. Blocking of IL-1 β resulted in increased mortality rate of infected mice rising to 100% and suggesting that IL-1 β inducer effect of MLT could be related to the beneficial effect of MLT during VEE virus infection. Likewise, MLT reduced the cytopathic effect of the virus in cell cultures. The increased nitrite-nitrate content and lipid peroxidation in infected cultures was blocked by MLT, suggesting a possible antioxidant effect of MLT as an additional protective mechanism against the VEE infection, besides the humoral immune response, since increased IgM antibodies anti VEE virus and IL-10 were also observed. The administration of Luzindole blocked the protective effect of MLT against the VEE infection. Luzindole is a competitive antagonist of different subtypes of MLT receptors. Splenocyte cultures infected with the VEE virus generated important amounts of NO and MLT reduced that production. In addition, treatment of splenocyte cultures with MLT induced increased levels of IL-2 and IL-1 β in the absence or the presence of PHA, and increased the proliferative response when the PHA was added to the cultures, suggesting an important effect of MLT on the biology of immune cells which are probably involved in the protective effect of the indole. Likewise, MLT decreased NO production, iNOS expression and lipid peroxidation induced by VEE virus in neuroblastoma cell cultures. In conclusion, MLT has a beneficial effect in experimental VEE virus infection, that could be related to the induction of IL-1 β , IL-2, IFN γ and IL-10 productions and to its antioxidant properties.

Key words: Melatonin, Venezuelan equine encephalitis, nitric oxide, malondialdehyde, Interleukin 1 β , oxidative stress, Luzindole.

I. INTRODUCCIÓN

Agente Etiológico

Las Encefalitis Equinas son enfermedades producidas por un virus de ARN, pertenecientes al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*. Según su etiología, se han identificado la Encefalitis Equina del Este (EEE), la Encefalitis Equina del Oeste (EEO) y la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) que afecta a équidos y a humanos, con una alta mortalidad y letalidad en individuos de todas las edades (**OPS, 1999, Rabinowitz et al., 1973; Mathews et al., 1989**). Estos virus aunque son inmunológicamente distintos, provocan enfermedades, que son clínicamente indistinguibles; existe además un cuarto miembro de este género que es el virus Highland, que sólo se ha reportado en el este de los Estados Unidos, específicamente en la Florida, y su presencia está asociada con casos de encefalomielitis en équidos (**Calisher et al., 1982; Acha y Szyfres, 1992; San Martín 1992; Blood y Radostis, 1993**).

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

Epidemiología

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

En la EEV se han identificado dos ciclos, el Enzoótico (Endémico) y el Epizoótico (Epidémico). El ciclo Enzoótico, se observa en las selvas húmedas de la América Tropical y regiones pantanosas donde la transmisión del virus se desarrolla y se mantiene en la naturaleza, entre roedores que actúan como reservorios y varias

especies de mosquito *Culex*, subgénero *melanoconium* que sirven de vectores, para transmitir la infección desde animales virémicos a otros susceptibles (Ludwig et al., 1975; Larreal, 1996). Este ciclo ocurre durante todo el año, ya que su presencia se ha podido demostrar mediante centinelización y aislamiento del virus en vectores y huéspedes (pequeños mamíferos y roedores) de esta enfermedad. En humanos, la infección por los virus enzoóticos solo 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).

El ciclo Epizootico, 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 équidos representan a su vez el huésped susceptible y son los principales amplificadores del virus epidémico. Los humanos se constituyen en huéspedes accidentales de la enfermedad. Este ciclo epidémico se caracteriza por una alta morbilidad en humanos y una alta mortalidad en équidos. 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).

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

Calisher y col., (1980); Walton y col., (1988); Weaver y col., (1992), destacan que desde el punto de vista epidemiológico, la característica más importante, es la que permite dividir a las variantes del virus de EEV en epizoóticas y enzoóticas; todas infectan y confieren inmunidad a los équidos y al hombre, pero 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.

Patogénesis de la infección por el virus de Encefalitis Equina Venezolana

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

La EEV en los humanos y équidos puede variar desde una infección inaparente, hasta una encefalitis o meningitis aguda. El período de incubación de esta enfermedad en los équidos varia de 3 a 5 días, siendo los síntomas iniciales, fiebre, inapetencia y depresión; seguidos por signos de hipersensibilidad al ruido y al tacto (Acha y Syfres, 1992). Los équidos afectados generalmente caminan en círculo y sin rumbo; por último, el animal presenta parálisis del tren posterior y cae en postración. Los síntomas de la enfermedad en el humano, se caracterizan por tener un comienzo abrupto, con un período de incubación, que varia 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**).

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

Prevención y control

Existe una vacuna para equinos basada en la cepa TC-83 que garantiza la no ocurrencia de brotes o epidemias de EEV. Para humanos existe una vacuna 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 de ADN recombinante, pero éstas no han demostrado ser mejores que las de virus atenuados debido a que los títulos que

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

Encefalitis Equina Venezolana, Respuesta inmunitaria y mediadores oxidativos

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

La infección por este virus en el sistema nervioso central (SNC), produce daño a nivel celular, entre otros, por los metabolitos del proceso de oxidación, los cuales son originados por reacciones biológicas necesarias para la formación de compuestos de alta energía utilizados para los procesos metabólicos celulares. Involucran la transferencia de electrones que pueden generar radicales libres o especies de oxígeno reactivo (ROS) dentro de los cuales se encuentran el anión superóxido (O²⁻) y el anión hidroxilo (OH \cdot), así como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Skaper, 1999). Estos radicales libres en conjunto con las especies reactivas de nitrógeno (Zinder et al., 1992) son fragmentos moleculares extremadamente reactivos que reaccionan agresivamente con otras moléculas y crean compuestos anormales originando el estrés oxidativo con el subsecuente daño en las células y tejidos. El ADN y otras macromoléculas son dañadas por estos radicales libres (Reiter, 2000; Skaper et al., 1999).

También se ha descrito que los productos de la peroxidación lipídica, por ejemplo el malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (4-HNE), son una de las consecuencias de este estrés que produce el daño oxidativo en las membranas (Reiter et al., 1998; Romero et al., 1998). Afortunadamente, el sistema inmunitario cuenta con una serie de enzimas y agentes antioxidantes que contrarrestan y protegen del daño oxidativo. Las enzimas antioxidativas clásicas incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa, (GRd) y la catalasa (CAT) (Reiter, 2000).

El MDA participa en algunos procesos virales, tal como ha sido descrito en niños infectados con el Virus de Inmunodeficiencia Humana. La infección por este virus ha sido asociada con el estrés oxidativo, produciéndose un incremento de la concentración de MDA en niños e infantes seropositivos y la disminución de antioxidantes en suero (Jareno et al.,1998; Sonnerborg et al.,1988). La existencia de una correlación negativa entre los niveles séricos de MDA en estos pacientes y el conteo de linfocitos CD4+ confirman el involucramiento del estrés oxidativo en la fisiopatología de esta infección (Jareno et al., 1998).

La infección por EEV causa un aumento en la producción de múltiples genes pro-inflamatorios que incluye los de la iNOS y del TNF α , sugiriendo que la respuesta inflamatoria es en parte mediada por esta enzima y el TNF α podría contribuir a la neurodegeneración luego de la infección por EEV (Schoneboom, 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 ON, indicando que los astrocitos cumplen un importante papel en la encefalitis inducida por virus y la interacción entre las células gliales y las neuronas podría ser importante en la patogénesis de la EEV (Schoneboom et al, 1999).

Melatonina

La interrelación entre la respuesta inmunitaria y el sistema nervioso, se ha hecho evidente por la existencia de un eje de regulación neuroendocrino-inmunitario y el descubrimiento de receptores para neurotransmisores en algunas células inmunitarias (Finnochiaro et al., 1991; Guerrero et al., 1994; Dubocovich M., 2005). Adicionalmente se ha reportado que las hormonas neuroendocrinas regulan diversos efectos sobre las células inmunitarias (Finnochiaro et al., 1991). Entre las neurohormonas y neuropéptidos que influyen en el sistema inmunitario se incluye la Melatonina (MLT) como un importante miembro de las indolaminas. La MLT (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona producida principalmente por la glándula pineal y la retina de los vertebrados, incluyendo humanos. Sin embargo, se ha encontrado en otra variedad de tejidos como en glándulas lagrimales extra orbitales (Mhatre et al., 1988), porciones del tracto gastrointestinal (Vakkuri et al., 1985) y ciertas células sanguíneas (Finnochiaro et al., 1988,1991). Participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos. Es sintetizada a partir del triptófano y es vertida a la circulación para alcanzar sus tejidos blancos, entre los que se encuentra el SNC (Reiter, 1991).

Una de las características más resaltantes con respecto a la biosíntesis pineal de la MLT es su variabilidad a lo largo del ciclo de 24 horas y su respuesta precisa a cambios en la iluminación ambiental (Caroleo et al., 1992). La síntesis y secreción de la MLT sigue un ritmo circadiano y ocurre durante la activación nocturna de los receptores pineales β -adrenérgicos. La función principal de la MLT es actuar como transductor de la influencia del ciclo luz-oscuridad sobre la fisiología del cuerpo. En humanos, las variaciones del ritmo circadiano en la MLT plasmática, han sido asociadas con la pubertad, ciclo menstrual, desórdenes afectivos, cáncer y con problemas de la insuficiencia renal experimental (Maestroni et al., 1986). 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 las células inmunitarias (Angeli et al. 1988, Cuesta et al., 2008, Giannoulia et al., 2006, 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 interferón gamma ($IFN\gamma$) por esplenocitos müridos, 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 Interleucina -1 (IL-1) y la citotoxicidad de los monocitos contra células tumorales (Morrey et al., 1994). También es capaz de aumentar la presentación antigénica por macrófagos esplénicos a las células T e incrementar la producción de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CMH) clase II y el $TNF\alpha$ (Pioli et al., 1993).

La MLT inhibe la proliferación de linfocitos estimulados por mitógenos (Finochiaro et al., 1988) y corrige algunos estados de inmunodeficiencia causado por el estrés (Maestroni et al., 1987; Caroleo et al., 1992; y Maestroni, 1999), el envejecimiento (Caroleo et al., 1992; Humbert, 1993 y Atre et al., 1998), algunas drogas (Caroleo et al., 1992; Maestroni, 1998,1999; Maestroni et al., 1994) y las enfermedades virales (Lissoni et al.,

1993; Ben Nathan, 1994, 1995; Bonilla et al., 1997; Maestroni, 1999). Con respecto a estas últimas, diversos autores, reportan el efecto protector de la MLT en infecciones virales producidas por los virus Semliki Forest, West Nile (Lissoni et al., 1993; y Ben-Nathan et al., 1995) y Encefalitis Equina Venezolana (EEV) (Bonilla et al., 1997) al prolongar la sobrevivencia de ratones y retardar el inicio de la enfermedad.

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 , IL-2 y péptidos opioides, los cuales estimulan la respuesta efectora.

La MLT cumple sus funciones a través de la donación de un electrón directamente, secuestrando radicales superóxido e hidroxilo altamente tóxicos. La MLT limita la peroxidación lipídica inducida por ON, inhibe la sintetasa de ON 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 y col. (1994,1995), fueron los primeros en demostrar el efecto protector de la MLT en ratones infectados con el virus Semliki Forrest (SFV) y en

ratones sometidos a estrés inoculados con el virus West Nile atenuado- no invasivo. Este efecto se evidencia por el aumento en la tasa de supervivencia en estos ratones. Resultados similares reportaron Bonilla y col., (1997); y Valero y col., (1999) en ratones infectados con el virus de EEV.

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

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

Melatonina, receptores y antagonistas

Los mecanismos mediante los cuales la MLT interviene en la función del sistema inmunitario son complejos y probablemente son mediados por la activación de distintos subtipos de receptores de alta afinidad de membrana y/o nucleares de la MLT (Dubocovich et al., 1997), los cuales han sido identificados directamente en linfocitos circulantes, esplenocitos y timocitos (González-Haba et al., 1995; Guerrero et al., 1994; López-González et al., 1992). Además, por ser un componente altamente lipofílico, la MLT puede penetrar sin mediación de receptores específicos y actuar dentro de las células como un potente secuestrador de radicales libres y como un factor anti-envejecimiento y oncostático (Skwarlo-Sonta, 1996; Maestroni et al., 1990, 1995, 1988; Atre y Blumenthal, 1998; Neri et al., 1998).

El Luzindole (N-acetil-2-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 inmunoreguladoras de la MLT y además se ha demostrado que es activo *in vivo*

(Dubocovich, 1988). Sin embargo, estudios previos han determinado que el Luzindole (LZ) no bloquea el efecto antioxidante de la MLT, a pesar de inhibir los receptores para la misma (Behan et al., 1999; Nava et al., 1997).

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

El receptor MT1 está expresado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y en los vasos cardiacos; además, está involucrado en la modulación del ritmo circadiano (Dubocovich et al., 1998; Liu et al., 1997) y en la modulación y constricción de los vasos (Doolen et al., 1998). También se expresa en los tejidos periféricos y en otras regiones del cerebro (Clemens et al., 2001; Ram et al., 2002; Scher et al., 2002; Zhao et al., 2000; Zhao et al., 2002). Además de su vasta distribución en los tejidos, el receptor MT1 puede acoplarse a una amplia variedad de proteínas G incluyendo $G_{i\alpha 2}$, $G_{i\alpha 3}$, $G_{i\alpha q}$ (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 mas limitados en su localización, encontrándose en el cerebro, núcleo supraquiasmático del hipotálamo, la retina, riñones, ovarios, vasos cardiacos y varias líneas celulares cancerígenas (Dubocovich, 2001; Witt-Enderby, 2000; Von Gall et al., 2002); de manera similar a los receptores MT1, los MT2 se acoplan para inhibir la formación del AMPc en varios

modelos transfectados (Jones et al., 2000; Brydon et al., 1999; MacKenzie et al., 2002; Reppert et al., 1995).

A diferencia de los receptores MT1, la expresión del MT2 en las células HEK293, también ocasiona un descenso en GMPc (Petit et al., 1999). 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 (Paula et al., 2003).

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 mas a la MLT, la activación de células T, significativamente incrementa la unión a MLT; los sitios de unión a MLT y los ARNm de estos receptores, fueron

hallados mayormente en células T ayudadoras humanas, pero también en CD8+ 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 receptores para MLT. Además, los receptores de membrana y nucleares para MLT, se han descrito en células inmunocompetentes en humanos y en roedores (Rafii et al., 1998).

Sitios de unión específicos para MLT han sido descrito 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 rol específico y relativo de receptores de membrana y nucleares sigue aun sin dilucidar (Maestroni, 2001).

Oxido Nítrico

El Óxido Nítrico (ON) es una sustancia vasodilatadora que se ha relacionado ampliamente con la regulación del tono vascular, tanto en condiciones normales como patológicas (Lee et al., 1992; Castro et al., 1993; Moncada et al., 1993). Se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS) y es una molécula altamente inestable, con una vida media de 6 segundos, que se degrada rápidamente a nitratos y nitritos (Stuehr et al., 1985).

Han sido identificadas tres isoformas de NOS: sintetasa del óxido nítrico neuronal o tipo I, sintetasa del óxido nítrico inducible o tipo II y sintetasa del óxido nítrico endotelial o tipo III. La NOS inducible (iNOS) es sintetizada en los macrófagos, células musculares lisas, células estrelladas hepáticas, hepatocitos, y muchos otros tipos celulares, sólo tras inducción por lipopolisacárido (LPS) y citocinas proinflamatorias. Una vez expresada, la iNOS sintetiza grandes cantidades de óxido

nítrico durante largos periodos de tiempo, independientemente de estímulos hemodinámicos o mecánicos (Sessa W., 1994). En contraste, la NOS endotelial (eNOS) libera ON durante periodos cortos de tiempo en respuesta a varios tipos de estímulos, tanto endógenos como exógenos, incluyendo entre estos los estímulos físicos (Takahashi et al., 1997). Aunque inicialmente la localización de este enzima fue demostrada en las células endoteliales, se ha visto que la expresan también otros tipos celulares, como células mesangiales, gliales, neuronales, y las del epitelio respiratorio.

El ON es una molécula pequeña, simple, extremadamente lábil, de corta vida y altamente nociva debido a su estructura de radical libre; posee un electrón extra que le confiere una elevada reactividad (Zinder et al., 1992). También puede ser producido por un grupo de compuestos conocidos como donadores de ON como el Nitroprusiato de Sodio (NPS) (Lahiri et al., 1999). El ON es sintetizado en células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y células neuronales (Di Mascio et al., 2000). La NOS juega un importante papel en la regulación cardiovascular, en las funciones del SNC y periférico, en las funciones inmunitarias y otros mecanismos homeostáticos. Sus formas inducibles pueden ser expresadas en muchos tipos de células incluyendo macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, células mesangiales y condrocitos (Gilad et al., 1998).

Sin embargo, la elevada producción de ON 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 ON producidos por la iNOS sugieren que esta molécula es un factor patogénico en esta infección (Fujii et al., 1999).

Algunos autores como Shoshkes y Komatsu (1998), reportan que la producción de ON 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 ON 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 ON en las infecciones virales.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La EEV es una infección de gran relevancia clínica y económica en el 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. 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 sistema nervioso central (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, el sistema inmunitario es capaz de controlar la infección por inducción de un daño inflamatorio de intensidad variable.

Debido a la relevancia que el sistema inmunitario cumple en la patogénesis de la infección por el virus de EEV, es posible que aquellas moléculas que modulan su actividad reguladora y/o efectora pudieran poseer acciones terapéuticas. La función del sistema inmunitario está regulada por diferentes mecanismos entre los que se incluyen los de origen neuroendocrino. La MLT es una hormona que posee un efecto regulador directo sobre diversas poblaciones linfocitarias y accesorias, y sobre la respuesta inmunitaria inflamatoria producida por algunos arbovirus entre los que se mencionan los virus Semliki Forrest y West Nile. Sin embargo, a pesar de las relevantes propiedades atribuidas a la MLT, no se ha dilucidado si el mecanismo de acción en estas infecciones virales, es por un efecto directo sobre el virus o si, por el contrario, su acción es indirecta, mediada por la estimulación de células inmunocompetentes, posiblemente con participación de los receptores de MLT que presentan estas células. En base a estos antecedentes, se plantea investigar el posible efecto terapéutico de la MLT sobre la infección por el virus de EEV, hallazgo que constituye el objetivo de la presente investigación.

OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el efecto inmunomodulador y la relevancia terapéutica de la MLT en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* de infección por el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2. Evaluar el efecto de la administración exógena y de la inducción de la producción endógena de MLT, así como del bloqueo de los receptores para MLT, sobre la supervivencia y la carga viral en un modelo animal de infección por el virus de EEV.
3. Determinar el efecto de la MLT sobre la respuesta inmunitaria inflamatoria a nivel sistémico y en el SNC en un modelo animal de infección por el virus de EEV.
4. Analizar el efecto de la MLT sobre las alteraciones metabólicas y oxidativas inducidas *In vitro* por el virus de EEV en células del sistema inmunitario y del SNC.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

SISTEMA *IN VIVO*

Animales

Se utilizaron ratones machos NMRI albinos obtenidos del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), con un rango de peso de 25 a 30 gramos y alimentados “ad libitum” con ratarina y agua de chorro, mantenidos en ambiente de temperatura de 24 °C bajo ciclos de 12 horas luz/ oscuridad. Los animales fueron agrupados en numero de 15-20 por jaula, distribuidos en grupos experimentales para los ensayos *in vivo*: a) control con solución salina fosfatada (PBS) estéril sometidos a las mismas condiciones, b) tratados con 250, 500 y 1000 µg de MLT/Kg. de peso corporal, c) infectados con EEV y d) infectados y tratados con 250, 500 y 1000 µg de MLT/Kg.

Para los ensayos *in vitro* con esplenocitos se utilizaron ratones sanos.

SISTEMAS *IN VITRO*

Cultivo de Fibroblastos de embrión de pollo

Se utilizaron huevos de pollo embrionados de 11 días de incubación para la elaboración de monocapas confluentes de fibroblastos de embrión de pollo (FEP), crecidos a una concentración de 1×10^5 cel/ml como cultivos primarios y sensibles a la replicación del virus de EEV (Bergold y Mazzali, 1968). Se determinó microscópicamente el grado de destrucción celular contando un mínimo de 200 cel/pozo con un rango de reproducibilidad del 5%.

Cultivo de esplenocitos de ratón

Los ratones sanos fueron sacrificados por dislocación cervical y los bazos removidos asépticamente. Las suspensiones celulares fueron preparadas siguiendo la técnica

descrita por Hudson y Hay (1980), empleando medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA), suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) para resuspender. Las células rojas fueron lisadas con buffer (NH_4CL 0.16 M, NaHCO_3 0,03 M y EDTA 0,0001 M). La viabilidad de las suspensiones celulares se realizó utilizando la técnica de exclusión del colorante azul tripán. Las células viables (95%) fueron ajustadas a una concentración de 2×10^6 células/ml de suspensión.

Alícuotas de las diferentes suspensiones celulares, según esquema de tratamiento con MLT, fueron cultivadas por triplicado en paralelo en dos placas de microtitulación de 96 pozos, en presencia (10 $\mu\text{g/ml}$) o ausencia de PHA. Las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 por un periodo de 72 horas. Ocho horas antes de culminar el periodo del cultivo, a una de las placas se le agregó la timidina tritiada (Metyl- ^3H) (NENTM Boston, USA), incubando luego bajo las mismas condiciones y de otra placa, después de la incubación, se recolectaron los sobrenadantes de cultivo.

Con la finalidad de evaluar el posible efecto directo de MLT sobre el virus, se incubó una concentración de 6×10^7 UFP/ml del virus de EEV con un volumen igual de 500 $\mu\text{g/ml}$ de MLT. Después de 1 hora, esta preparación fue llevada a un gradiente lineal de 10 – 30% de sacarosa-TNE (Pedersen y Eddy, 1974). Se centrifugó por 2 horas a 90.000 x g en rotor SW-25, la banda opalescente se recolectó y resuspendió en TNE. En el precipitado se valoró la infectividad viral a través del ensayo de plaqueo, comparando el título con el del virus no pre-incubado con MLT, sometido a las mismas condiciones. Estas suspensiones de virus purificadas (EEV pre-incubado y no con MLT) se evaluaron *in vivo*, determinando la tasa de sobrevida de ratones inoculados con las mismas

Cultivo de Células de neuroblastoma múrido (Na₂)

Se utilizaron células Na₂ a una densidad de 1×10^6 células x ml de suspensión celular, las cuales fueron cultivadas en platos de cultivo de 24 pozos con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) suplementado con 1% de antibiótico-antimicótico, con 10% de Suero Fetal Bovino y en presencia de 5% de CO₂. En cada uno de los pozos que contenían las monocapas formadas de células Na₂, se colocó el virus de la EEV y la MLT a las concentraciones previstas, según el esquema de trabajo establecido. A las células control no se les colocó virus ni MLT y fueron sometidas a las mismas condiciones del ensayo.

Virus

El stock de virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) utilizado para los experimentos *in vivo* fue preparado en cultivo de células Vero (riñón de mono verde africano) el cual contenía $6,8 \times 10^7$ unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml). Los animales fueron inoculados intraperitonealmente (i.p.) con 0,05 mL que contenían 10 o 100 DL₅₀ de la cepa Guajira del virus EEV, diluida en solución borato-salina con albúmina bovina al 0,4%, estéril (BABS) (Hammon et al., 1969).

Para la inmunización de los animales se utilizó una suspensión de la cepa atenuada TC-83 del virus de EEV. Los animales fueron inmunizados con 0,05 ml de la vacuna que contenía $1,7 \times 10^6$ UFP/ml en 0,4% de BABS; en los días 7, 14 y 21 día post vacunación se les tomó muestra de sangre para la determinación de anticuerpos IgM anti EEV. El día 21 después de la inmunización los ratones tratados con MLT fueron sometidos a un reto antigénico con el virus vivo (10 DL₅₀) y cuatro días después se sacrificaron para determinarles títulos virales en cerebro.

MLT

Se utilizó MLT (Research Biochemical Internacional, MA, USA) diluida en solución salina fosfatada (PBS) estéril, a dosis de 250, 500, 1000 y 5000 µg por kilogramo de

peso ($\mu\text{g}/\text{Kg.}$) para el tratamiento *in vivo* de los animales, inoculada por vía subcutánea en volumen de 0,25 ml de las dosis señaladas. Los animales se inyectaron dos horas antes de oscurecer comenzando 3 días antes y continuando hasta 7 a 10 días después de la inoculación viral o inmunización (**Ben-Nathan et al., 1995**).

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

Para los ensayos *in vitro* se utilizaron dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los cultivos de FEP y de 1, 5, 10, 50, 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ según protocolo de tratamiento de las células esplénicas, diluida en medio de cultivo RPMI-1640 estéril. Para los ensayos con células Na_2 se utilizaron dosis de MLT de 0,025; 0,10; 0,25; 0,50; 1,0 y 1,8 mM (**Noda et al., 1995**).

Dexametaxona

Se utilizó Dexametaxona (DEX) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), a una dosis intramuscular de 5 mg/Kg. diluida en solución salina y administrada diariamente comenzando 10 días antes de la inoculación viral y continuando hasta 4 días después, para inducir inmunosupresión. (**Ben-Nathan et al, 1995; Bonilla et al, 2001**). Los ratones fueron divididos en 7 grupos experimentales: Control, DEX, DEX+MLT, DEX+EEV, DEX+MLT+EEV, EEV y MLT.

Luzindole

Se utilizó Luzindole L-2407 (SIGMA), a una concentración de 2,5 y 5 mg/Kg. de peso, diluido en agua destilada estéril y suministrado por vía i.p. (**Ray et al., 2004**).

Evaluación del efecto antagonista del Luzindole en ratones

Los ratones fueron agrupados en números de 15 por jaula. Se formaron 10 grupos experimentales los cuales estaban representados por: el grupo 1 (PBS), administrado (i.p) durante el curso del experimento. El grupo 2 (MLT), formado por ratones tratados con 50µl de MLT a una concentración de 500 µg/Kg. El grupo 3 (LZ), formado por ratones tratados con LZ. El grupo 4 (EEV), formado por ratones infectados i.p con 50µl que contenían 10 DL₅₀ del virus, suspendidas en solución borato - salina con albúmina bovina al 0,4%, estéril (BAB´S 0,4%). El grupo 5 (MLT+EEV), correspondió a ratones que se inocularon por vía s.c con 50µl de la dosis señalada de MLT según esquemas de pretratamiento de 3 días antes de la inoculación del virus. La MLT fue inyectada dos horas antes de oscurecer (entre 5:00 y 6:00 PM). El grupo 6 (MLT+LZ), formado por ratones tratados con MLT y LZ. El grupo 7 (MLT+EEV+LZ pre 2,5mg/Kg.), ratones tratados con MLT, EEV y LZ; este último fue administrado al inicio del tratamiento con MLT. El grupo 8 (MLT+EEV+LZ pre 5mg/Kg.), ratones tratados con MLT, EEV y LZ administrado al inicio del tratamiento con MLT. El grupo 9 (MLT+EEV+LZ post 2,5mg/Kg.), ratones tratados con MLT, EEV y LZ; este último fue administrado luego de la infección viral. El grupo 10 (MLT+EEV+LZ post 5mg/Kg.), ratones tratados con MLT, EEV y LZ; este último fue administrado luego de la infección viral.

Recolección de muestras

Los animales se sacrificaron a diferentes periodos post infección (p.i) en número de cinco por cada grupo experimental. La recolección de sangre completa se hizo del seno orbital (ángulo interno del ojo) o por punción cardiaca del ratón, en tubos sin anticoagulante para la obtención del suero, para la determinación de títulos virales, anticuerpos IgM e IgG anti EEV y concentración de citocinas, ON y MDA. Simultáneamente a la recolección de sangre se extrajo el cerebro de algunos animales de cada grupo, previa perfusión con solución salina. A los mismos se les determinó el contenido de proteínas, ON, MDA y citocinas (IL-1β, TNFα).

Determinación del Título Viral

Los títulos de infectividad viral tanto en suero como en homogeneizados de cerebro (Suspensiones al 20% en buffer Tris-HCL 50 mM pH 8.0 de acuerdo al peso del mismo) se determinaron por la Técnica de Plaqueo de Bergold y Mazzali (1968), en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP), crecidos a una concentración de 1×10^5 cel/ml. Diluciones seriadas del virus fueron inoculadas en monocapas confluentes. Después de 1 hora de adsorción, se colocó una sobrecapa de agar (Overlay). 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%.

La DL₅₀ intraperitoneal (i.p.), que se inyectó al ratón, se calculó por el método de Reed-Muench, (1938).

Determinación de citocinas

La determinación cuantitativa de las diferentes citocinas: IL-2, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10 y GM-CSF se realizó empleando el sistema de ELISA de fase sólida desarrollado por Amersham International plc (Biotrack™). La técnica consiste en un ensayo cuantitativo de ELISA tipo sandwich, en la cual se hace reaccionar la muestra con un anticuerpo monoclonal de captura específico para cada una de las citocinas a ensayar fijado a una fase sólida, sobre la cual se adiciona un anticuerpo monoclonal biotinilado. Luego de un período de incubación y posterior a una fase de lavado, se le agrega un complejo Streptavidina-peroxidasa que se unirá al anticuerpo biotinilado. Posterior al periodo de incubación y lavado, se agrega el sustrato de tetrametil benzidina (TMB). La reacción enzima-sustrato se evidenciará por el desarrollo de un color cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de citocina presente en la muestra. 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 y que se incluyen simultáneamente al procesamiento de las muestras. Los resultados fueron expresados en pg/ml.

Ensayo de bloqueo

Con la finalidad de determinar la posible implicación del $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, y $\text{TNF}\alpha$, en el papel protector ejercido por la MLT, se incluyó un ensayo de bloqueo in vivo de cada una de estas citocinas, las cuales fueron neutralizadas siguiendo esquemas y dosis que previamente han demostrado la inhibición in vivo de la actividad de cada una de las mismas, reportadas de la siguiente manera:

- Se inyectaron por vía intravenosa (i.v) 200 μl de anticuerpo monoclonal anti $\text{IFN}\gamma$ de ratón (Amablemente suministrado por el Dr. Gresser, Viral Oncology, Francia) (Título de neutralización de $1:10^6$ contra 8 unidades de $\text{IFN}\gamma$) por animal, a las 4 y 48 horas antes de la infección viral con EEV (Ozmen et al., 1995).
- El anticuerpo monoclonal anti $\text{IL-1}\beta$ de ratón (35F5 Isotipo Rat IgG_1) (PharMingen BD, co.) fue inoculado por vía intraperitoneal (i.p) 12 horas antes de la infección (Mcintyre et al., 1994).
- 20 μg /Kg. de peso corporal en solución salina de anticuerpo monoclonal anti $\text{TNF}\alpha$ de ratón (Celltech, UK) fueron inyectados por vía i.p 24 horas antes de la infección (Orange et al., 1995).

Se determinó la tasa de mortalidad de los animales en los diferentes esquemas de bloqueo, concentración de MLT y dosis viral.

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 y col. (1988), la cual consiste en sensibilizar la placa de 96 pozos con un anticuerpo anti IgM (anticadena μ específico) (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 colocó un antisuero

policlonal anti-EEV. Se añadió un anticuerpo (anti IgG de ratón) marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante, que al reaccionar sobre el sustrato ABTS (2,2´azino diethylbenzthiazoline sulfato), produjo una reacción colorimétrica que fue leída en un espectrofotómetro automático de placas (Microlector de ELISA Microwell System Reader 530 Organon Teknika Co.), después de haberse detenido la reacción con NaOH 3.0 M. Dentro de los treinta minutos siguientes a la coloración del sustrato las muestras fueron leídas a 405nm. En cada ensayo se incluyeron sueros controles positivos y negativos.

Determinación de Proteínas

La determinación de proteínas se realizó a través del Método de Lowry. Es un método sensible basado en el reactivo de Folin-Ciocaltiu fenol. En este método, las proteínas reaccionan con cobre en solución alcalina, formándose un complejo cobre-proteína. El complejo formado, y la tirosina y triptófano presentes, reducen los ácidos fosfostúngstico-fosfomolibdico a un producto coloreado con una $A_{\text{máx}}$ a 750 nm. Las concentraciones de proteínas se reportaron en g/dl (Sapan et al., 1999).

Cuantificación del Óxido Nítrico

La determinación de ON se realizó mediante un ensayo de diazotización, basado en la Reacción de Griess. La prueba 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 (Wu et al., 2001). Los valores fueron expresados en $\mu\text{M/L}$. Para los ensayos *in vitro* se tomaron sobrenadantes por triplicado de los cultivos para las determinaciones de las concentraciones de ON a las 6, 12, 24 y 48 h post-infección. También se tomaron células (previamente lisadas por sonicación, centrifugadas a 10,000 g x 5 minutos a 4°C) para la determinación del contenido de proteínas y ON (Lahiri, et al., 1999; Noda, et al., 1999).

Determinación de Malondialdehído

La determinación de MDA se llevó a cabo por el Método colorimétrico del Ácido Tiobarbitúrico (TBA) que comprende inicialmente una etapa de precipitación proteica, en la cual se incorpora inicialmente el ácido tiobarbitúrico que produce una reacción directa con la fracción de MDA presente en la muestra, luego se agrega una mezcla de butanol-piridina que separa la muestra en tres fases: una proteica, una lipídica y una acuosa. La coloración desarrollada en la reacción es directamente proporcional a la concentración, la cual es medida contra un blanco reactivo a 532 nm. Los datos obtenidos se interpretaron en una curva estandarizada para el cálculo de la concentración expresada en nmol/L (Sonnerborg, et al., 1988).

Análisis Estadístico

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

IV. RESULTADOS

Evaluación del efecto protector de la MLT en la infección con EEV

Al día 6 después de la inoculación viral (10 DL₅₀ /ratón) la tasa de mortalidad, en los ratones tratados con 250, 500 y 1000 µg de MLT /Kg. de peso fue de 45, 40 y 16%, respectivamente, con respecto al 100% de grupo de ratones infectados no tratados. Además, el tratamiento con MLT retrasó el inicio de la enfermedad y prolongó el tiempo de muerte en los ratones tratados (6 días vs. 8 días) (Tabla 1 y Figura 1).

TABLA 1.- EFECTO DE LA MLT SOBRE LA TASA DE SOBREVIVENCIA DE RATONES DESPUÉS DE INOCULADOS CON EL VIRUS DE EEV

Tratamiento	Muertos/Total	% Muertos	Días promedio de muerte
EEV	25/25	100	6
EEV + 250 µg MLT/Kg.	9/20	45*	8
EEV + 500 µg MLT/Kg.	10/25	40*	10
EEV+ 1000 µg MLT/Kg.	4/25	16*	10

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

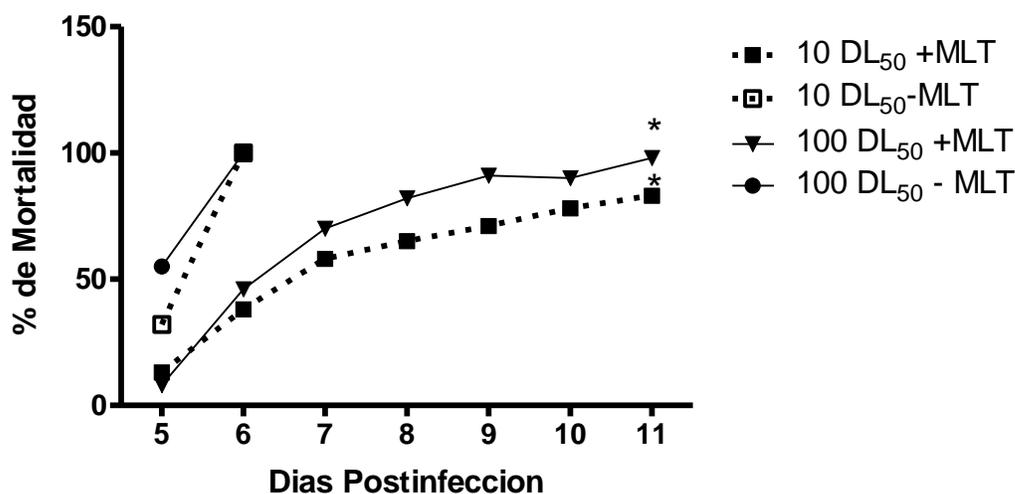


Figura 1. Efecto de la MLT sobre la tasa de mortalidad (n=15) de ratones inoculados con 10 y 100 DL₅₀ de virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV). La MLT (500 µg/Kg.) se inyectó vía subcutánea, diariamente (5-6 pm) 3 días antes y durante 10 días después de infección. *p<0,05 comparado con el control.

Los títulos de anticuerpos IgM anti EEV, en los ratones que sobrevivieron tratados con 500 µg de MLT /Kg de peso, 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.

Con respecto a los niveles de virus en el cerebro de los ratones infectados con el virus de la EEV, la administración de MLT disminuyó significativamente (p<0,05) los niveles de virus en el cerebro, comparados con los ratones infectados no tratados, en el día 3 (9,19 vs. 8,22 Log₁₀ UFP/g), en el día 4 (8,87 vs. 8,22) y en el día 5 (8,48 vs. 0) (Tabla 2).

TABLA 2.- EFECTO DE LA MLT SOBRE LOS TÍTULOS VIRALES EN CEREBRO DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE EEV

TRATAMIENTO	Log ₁₀ UFP/g		
	Día 3	Día 4	Día 5
EEV	9,19±0,04	8,87±0,07	8,48±0,10
EEV+ MLT	8,22±0,07*	8,22±0,09*	no detectado

La MLT (500 µg/Kg.) fue inyectada s.c diariamente (5-6 p.m), comenzando 3 días antes y continuando hasta 10 días después de la inoculación viral. Seis ratones de cada grupo fueron sacrificados diariamente para el ensayo. Los valores son expresados como promedios ± EE. *p< 0,05 comparado con el grupo EEV.

En cuanto a los niveles de viremia en los ratones infectados, se determinó una disminución en el día 3 (5,00 vs. 2,77 log₁₀ UFP/ml) p.i. No se detectó virus en sangre el día 5 en los ratones infectados, tratados y no tratados con MLT (Tabla 3).

TABLA 3.- EFECTO DE LA MLT SOBRE LOS TÍTULOS DE VIREMIA EN RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA EEV.

TRATAMIENTO	Log ₁₀ UFP/g		
	Día 3	Día 4	Día 5
EEV	5,00 ± 0,14	3,50 ± 1,03	no detectado
EEV+ MLT	2,77 ± 0,10*	1,96 ± 0,69	no detectado

La MLT (500 µg/Kg.) fue inyectada s.c diariamente (5-6 p.m), comenzando 3 días antes y continuando hasta 10 días después de la inoculación viral. Seis ratones de cada grupo fueron sacrificados diariamente para el ensayo. Los valores son expresados como promedios ± EE. *p< 0,05 comparado con el grupo EEV.

Cuando los ratones fueron pre-tratados con MLT en esquema de 7 y 10 días antes de la inoculación viral, se incremento significativa y proporcionalmente la tasa de sobrevivida, comparado con los ratones con 3 días de pre tratamiento (Tabla 4).

TABLA 4.- EFECTO DEL TIEMPO DE PRE TRATAMIENTO CON MLT SOBRE LA TASA DE SOBREVIVENCIA DE RATONES INOCULADOS CON 10 DL₅₀ DEL VIRUS DE LA EEV

DÍAS DE PRETRATAMIENTO CON MLT	MORTALIDAD/TOTAL	% DE MORTALIDAD
3	6/15	40%
7	5/20	25%*
10	4/15	27%*

En el sexto día después de la inoculación viral los ratones no tratados con MLT presentaron una tasa de mortalidad de 100%. *p<0,05 comparado con el grupo de 3 días de pre tratamiento.

Se observó una evidente reducción del grado de destrucción celular en los cultivos de fibroblastos de embrión de pollo tratados con MLT en presencia de diluciones seriadas del virus de EEV (Figura 2).

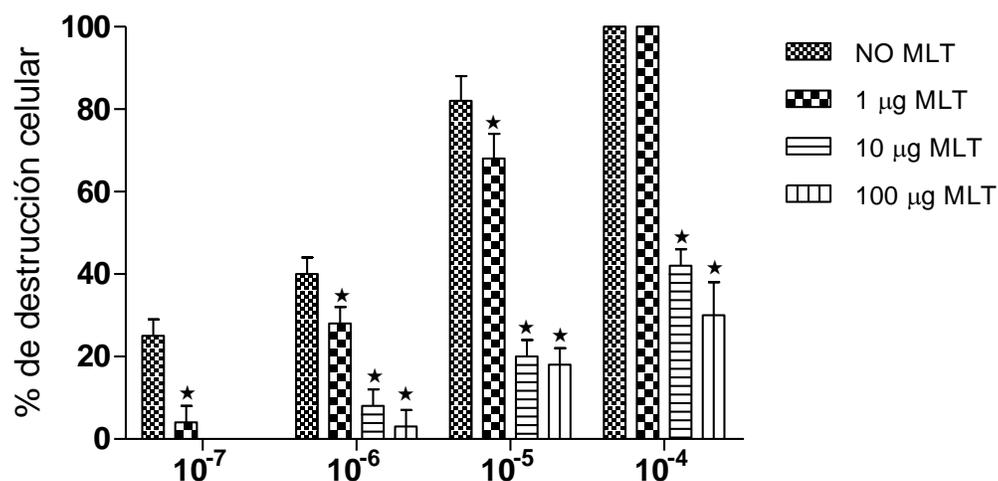


Figura 2. Efecto de la MLT sobre la destrucción celular de cultivos de fibroblastos de embrión de pollo infectados con diluciones seriadas de virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV). *p< 0,001 con respecto al grupo control (No MLT)

La MLT no estimuló la síntesis de IL-2, pero, incrementó las concentraciones de IFN γ en el suero. En los ratones infectados, tratados y no tratados con MLT, los niveles séricos de IFN γ también se encontraron aumentados.

Evaluación del efecto de la MLT en la inmunodepresión

La administración de MLT aumentó significativamente ($p < 0,05$) la tasa de sobrevivencia de los ratones inmunodeprimidos infectados con EEV (DEX+EEV+MLT) en el día 6 después de la inoculación viral, de un 0% a 32% con respecto al grupo no tratado (DEX+EEV). En los ratones inmunodeprimidos infectados tratados con MLT se encontró una sobrevivencia final del 10% y en los infectados no tratados 0% (Figura 3).

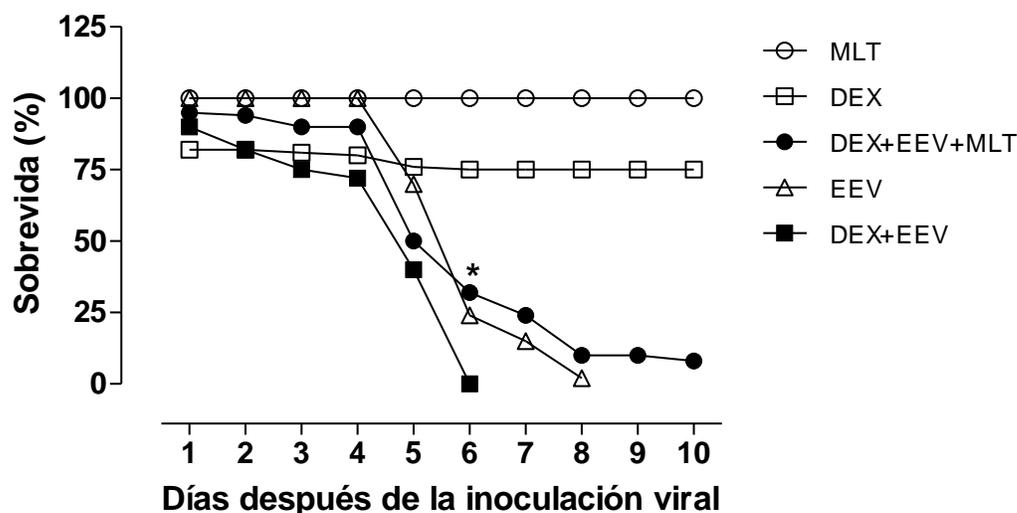


Figura 3. Tasa de sobrevivencia de ratones inmunodeprimidos infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) y tratados con MLT. Los ratones albinos machos inmunodeprimidos mediante la inyección con Dexametaxona (DEX) fueron infectados intraperitonealmente con 10LD₅₀ de la cepa Guajira del virus de EEV. La MLT (500 μ g/ Kg.) fue administrada diariamente, 3 días antes de la inoculación viral y 10 días después. * $p < 0,05$ comparado con el grupo DEX+EEV.

Con el fin de confirmar el estado de inmunodepresión inducida por la DEX, se determinó en la sangre de los ratones la cuenta leucocitaria. En el tercer y séptimo

día de tratamiento con DEX se observó un incremento significativo de los granulocitos ($p < 0,001$) y una disminución de los linfocitos ($p < 0,001$).

Se observó que la MLT produjo un incremento significativo de la concentración de GM-CSF en el suero de los ratones control y tratados con DEX los días 1, 3, y 5 p.i. viral (Tabla 5). Así mismo, se observó un incremento de los niveles de GM-CSF en los ratones inmunodeprimidos infectados tratados con MLT (DEX+EEV+MLT) el primer día, pero disminuyeron significativamente en los días 3 y 5 cuando se compararon con sus controles correspondientes (DEX+EEV). Se evidenció un incremento de las concentraciones de GM-CSF los días 3 y 5 p.i. en el grupo de ratones infectados comparados con el grupo control no infectado. En los animales infectados tratados con DEX se observó un incremento de GM-CSF el tercer y quinto día p.i. cuando se comparó con el grupo de ratones infectados (EEV).

TABLA 5.- NIVELES SÉRICOS DEL FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIA GRANULOCÍTICO MACROFÁGICO (GM-CSF) EN RATONES INMUNODEPRIMIDOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE EEV Y TRATADOS CON MLT

TRATAMIENTO	DÍAS POST- INOCULACIÓN		
	1	3	5
CONTROL	5,64 ± 0,97	6,70 ± 1,48	5,18 ± 1,02
DEX	7,45 ± 0,55	7,87 ± 0,85	7,58 ± 0,88
DEX+MLT	10,29 ± 0,87 ^{b,c}	13,88 ± 0,95 ^{a,b,c}	13,93 ± 0,87 ^{a,b,c}
DEX+EEV	8,46 ± 0,56	15,86 ± 0,56 ^{a,c}	18,43 ± 0,75 ^{a,c}
DEX+EEV+MLT	17,99 ± 0,94 ^{a,b,d}	12,04 ± 0,29 ^{a,b,d}	7,85 ± 0,93 ^{b,d}
EEV	6,95 ± 0,90	11,95 ± 1,06 ^a	9,94 ± 0,81 ^a
MLT	22,80 ± 1,07 ^a	22,06 ± 0,97 ^a	22,86 ± 1,42 ^a

Los valores son expresados en pg/mL, como promedio ± error estándar. La Dexametaxona (DEX; 5mg/Kg. de peso) fue administrada diariamente durante 10 días antes y 4 días después de la inoculación viral. ^a $p < 0,001$ comparado con el grupo control. ^b $p < 0,001$ comparado con el grupo MLT. ^c $p < 0,001$ comparado con el grupo DEX. ^d $p < 0,001$ comparado con el grupo DEX+EEV

Determinación de citocinas en suero

El tratamiento con MLT produjo un incremento significativo ($p < 0,001$) en los niveles séricos de IFN γ , en el grupo de ratones no infectados (2605 ± 107 pg/ml; 2772 ± 333 ; 3029 ± 403 pg/ml; 1626 ± 296 pg/ml; 1531 ± 353 pg/ml; 1469 ± 249 pg/ml), comparados con el grupo control ($493,66 \pm 74$ pg/ml; 574 ± 102 pg/ml; 615 ± 6 pg/ml; 621 ± 121 pg/ml; 551 ± 145 pg/ml; 510 ± 166 pg/ml) en todos los tiempos ensayados. También fue evidente un aumento en las concentraciones de IFN γ en los animales infectados con el virus de EEV (2705 ± 496 pg/ml; 3376 ± 163 pg/ml) al compararlos con el grupo control y con los ratones no infectados tratados con MLT (1531 ± 353 pg/ml; 1469 ± 249 pg/ml), en los días 5 y 6 p.i. Sin embargo, la administración de MLT no incrementó los niveles de IFN γ en los ratones infectados (2178 ± 760 pg/ml; 4219 ± 776 pg/ml) con respecto a los infectados no tratados con MLT (Figura 4).

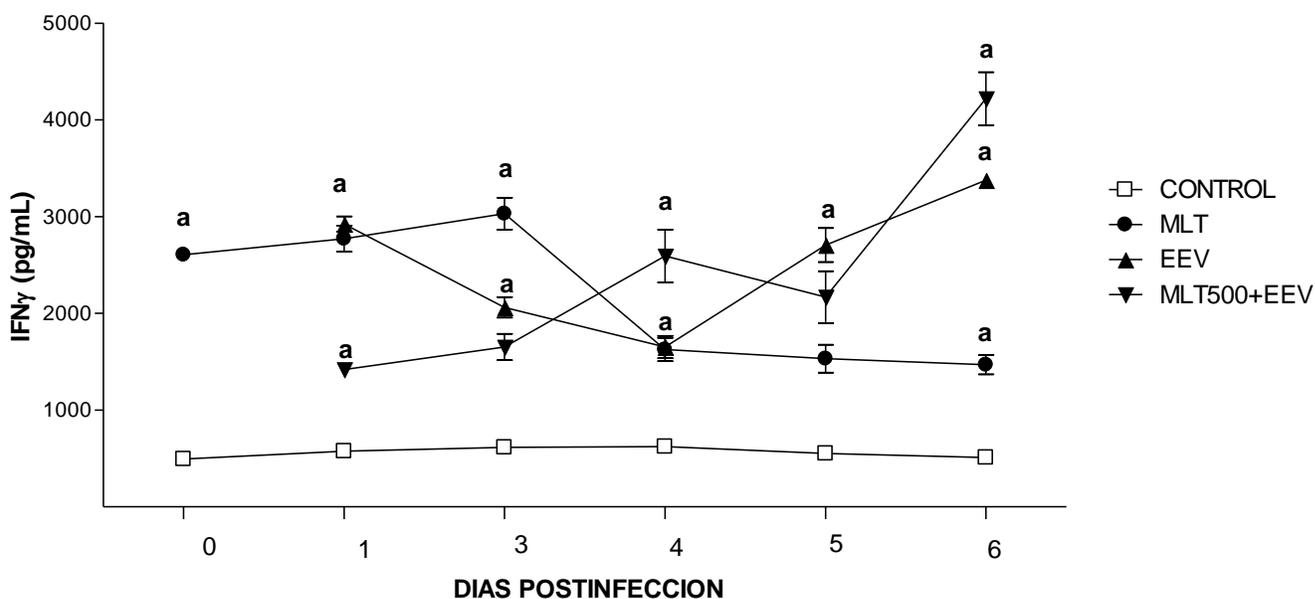


Figura 4.- Niveles séricos de IFN γ en ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana y tratados con Melatonina a diferentes estadios post-infección. ^a $p < 0,001$ con respecto al grupo control.

Las concentraciones séricas de IL-2, no mostraron diferencias entre los ratones infectados tratados o no con MLT y el grupo control desde el día 2 al 6 p.i. En el quinto día p.i. los valores obtenidos fueron: control: $24,48 \pm 1,86$ pg/mL, tratados con MLT: $32,29 \pm 1,90$ pg/ml, EEV: $32,96 \pm 2,76$ pg/ml y EEV+ MLT: $28,26 \pm 1,51$ pg/ml.

No se observaron alteraciones significativas en el patrón sérico de la IL-4 en los grupos ensayados, durante los períodos de estudio. En el 5^o día p.i. los niveles detectados fueron: control: $54,33 \pm 3,07$ pg/ml, tratados con MLT: $75,40 \pm 5,78$ pg/ml, EEV: $59,90 \pm 10,76$ pg/ml y EEV+ MLT: $56,79 \pm 5,06$ pg/ml.

La MLT y la infección por el virus fueron capaces de inducir un incremento en los niveles de IL-1 β . Sin embargo, en los ratones infectados tratados con 500 μ g de MLT/Kg de peso, las concentraciones séricas de esta citocina se incrementaron significativamente ($p < 0,0001$), diez veces más desde el día 1 al 6 p.i., (1032 ± 122 pg/ml; 1090 ± 124 pg/ml; 1085 ± 171 pg/ml; 1384 ± 355 pg/ml; 1427 ± 522 pg/ml), cuando se compararon con los grupos restantes: EEV (147 ± 20 pg/ml; 168 ± 31 pg/ml; 180 ± 22 pg/ml; 194 ± 44 pg/ml; 187 ± 37 pg/ml; 160 ± 58), CONTROL ($14,53 \pm 2$ pg/ml; $11,32 \pm 1$ pg/ml; $14,96 \pm 3$ pg/ml; $13,89 \pm 3$ pg/ml; $15,22 \pm 2$ pg/ml; 11 ± 1 pg/ml), MLT (110 ± 13 pg/ml; 138 ± 11 pg/ml; 180 ± 12 pg/ml; 169 ± 34 pg/ml; 177 ± 17 pg/ml; 134 ± 43 pg/ml) (Figura 5).

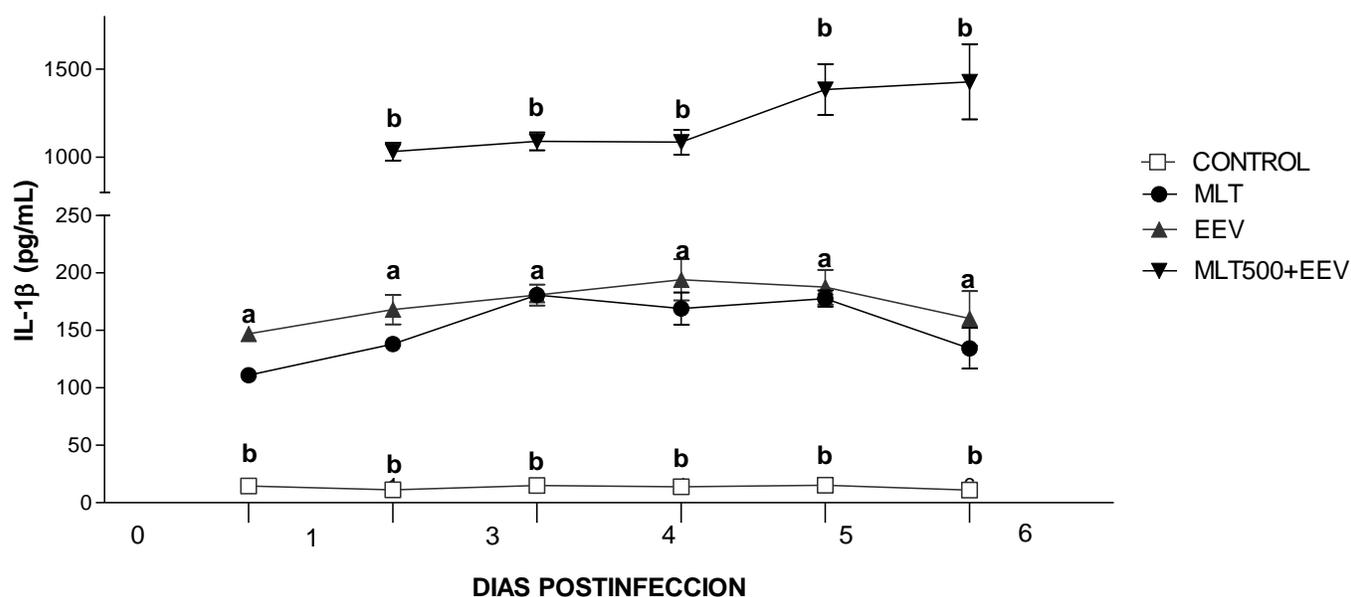


Figura 5.- Niveles séricos de IL-1 β en ratones infectados con el virus de la EEV en diferentes estadios postinfección. ^a $p < 0,0001$ con respecto al control, ^b $p < 0,001$ con respecto a los grupos restantes.

La inyección subcutánea de MLT aumentó significativamente ($p < 0,001$) los niveles sérico de TNF α cuando se compararon con el grupo control. Las concentraciones de TNF α en los ratones infectados con el virus de EEV (366 ± 60 pg/ml; 397 ± 76 pg/ml; 314 ± 70 pg/ml; 432 ± 90 pg/ml; 446 ± 67 pg/ml), fueron más altas ($p < 0,001$) que aquellas detectadas en los controles y en el grupo tratado con MLT (172 ± 73 pg/ml; 182 ± 53 pg/ml; 155 ± 42 pg/ml; 172 ± 46 pg/ml; 195 ± 68 pg/ml; 197 ± 69 pg/ml) en todos los tiempos ensayados. Interesantemente, desde el día 1 al día 6 p.i. se encontraron niveles más altos ($p < 0,01$) en los ratones infectados tratados con MLT (883 ± 85 pg/ml; 1035 ± 112 pg/ml; 1159 ± 124 pg/ml; 1202 ± 164 pg/ml; 1389 ± 120 pg/ml) que en aquellos infectados no tratados con la hormona (Figura 6).

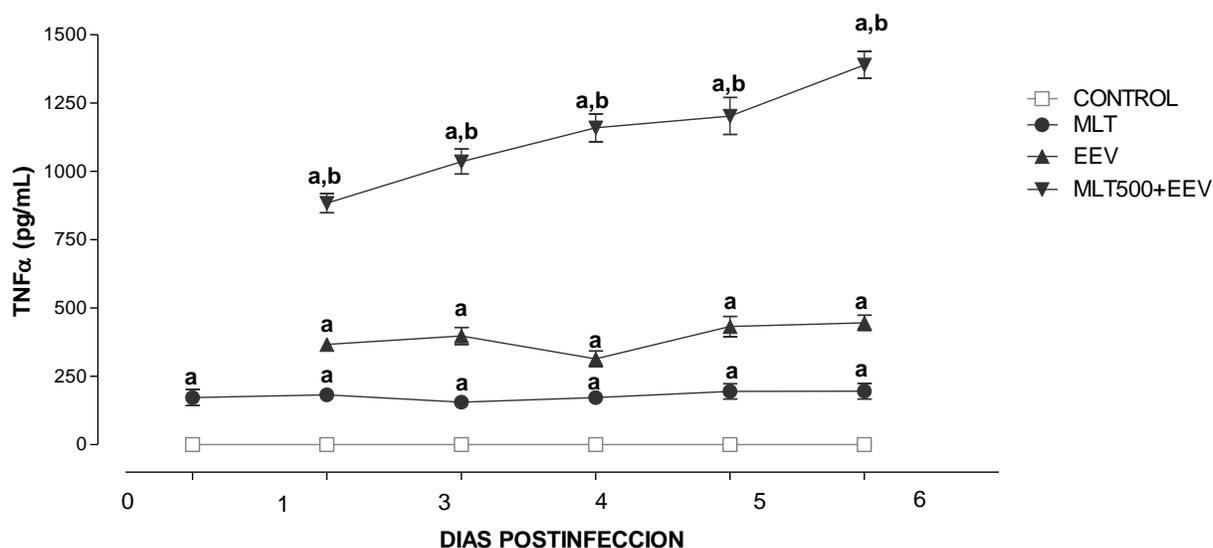


Figura 6.- Niveles séricos de TNF- α en ratones infectados con el virus de la E.E.V. en diferentes estadios postinfección. ^a $p < 0,001$ con respecto a los grupos restantes, ^b $p < 0,01$ con respecto a MLT.

La tasa de mortalidad al día 7 p.i. en el grupo de ratones tratados con 500 μ g de MLT/Kg de peso fue de 40%, comparado con el 100% de mortalidad observada en los ratones infectados no tratados.

Con la finalidad de confirmar si los ratones que sobrevivieron fueron infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana se determinaron los títulos de anticuerpos IgM anti EEV, cuyos valores se ubicaron en un rango de 1:5.120 a 1:10.240 tres semanas después de la inoculación viral.

El ensayo de bloqueo *in vivo* del TNF α e IFN γ no inhibió el efecto protector de la MLT observado previamente en los ratones infectados con EEV, mientras que cuando la IL-1 β fue neutralizada el 100% de los ratones murieron al quinto día p.i. (Tabla 6).

TABLA 6.- TASA DE MORTALIDAD PROMEDIO AL QUINTO DÍA POST INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA EEV, POSTERIOR A LA ADMINISTRACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IFN γ , ANTI- TNF α O ANTI- IL-1 β

GRUPOS	MORTALIDAD (%)			
	Anticuerpos Anticitocinas			No tratados
	Anti-IFN γ	Anti-TNF α	Anti- IL-1 β	
NO INFECTADOS	0,0	0,0	0,0	0,0
EEV	86,7 ^a	80,0	100,0	96,0
EEV+500 μ g MLT/Kg.	37,3 ^b	40,0 ^a	100,0	40,0 ^b

^aLos valores indicados representan el promedio de tres experimentos. Para cada experimento se ensayaron de 15 a 20 ratones. El porcentaje de mortalidad fue calculado utilizando un periodo de observación de 5 días p.i. A los ratones que sobrevivieron, se les determinó, a las tres semanas post infección, anticuerpos específicos IgM anti EEV. ^b $p < 0,001$ al comparar con el grupo de EEV correspondiente.

La preincubación del virus con la MLT no demostró efecto alguno sobre la mortalidad y el promedio del tiempo de sobrevivida de los ratones infectados (100% de mortalidad al 6 día p.i. tanto en los animales infectados con el virus preincubado, como en el no incubado con MLT). Fue similar el efecto obtenido sobre los títulos del virus, ensayados en cultivos de FEP, para ambos virus (el preincubado y el no incubado) ($6,9 \pm 0,09$ vs. $6,6 \pm 0,04$ Log₁₀ UFP/ml).

Determinación de TNF α e IL-1 β en homogeneizados de cerebros

En los ratones infectados con el virus de la EEV se obtuvo un incremento de los niveles de TNF α en homogeneizados de cerebros desde el 1º al 5º día p.i., alcanzando una concentración máxima de $1334,9 \pm 60,1$ pg/g de tejido en el 5º día, treinta veces más altos que los niveles detectados en los ratones control ($44,8 \pm 4,0$) ($p < 0,001$).

Así mismo, se evidenciaron en los ratones infectados tratados con 500 μ g de MLT/Kg de peso niveles disminuidos de TNF α ($p < 0,0001$), cuando se compararon con los

encontrados en los infectados no tratados con MLT los días 1, 3, 4 y 5 p.i. La administración de MLT incrementó significativamente el TNF α , con respecto al grupo control no tratado desde el 1^o al 5^o día p.i. ($p < 0,05$) (Figura 7).

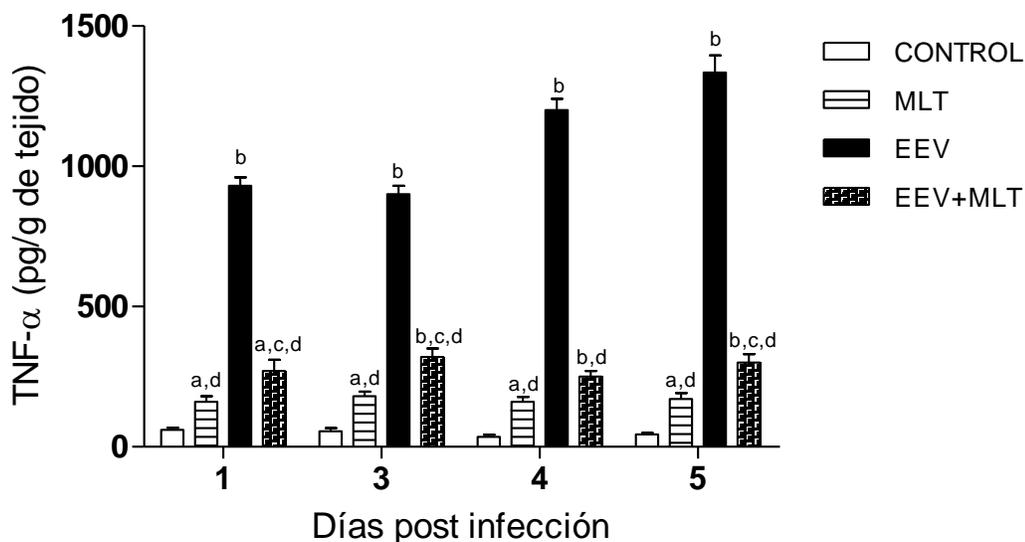


Figura 7. Niveles de TNF- α en homogeneizados de cerebro de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV) y tratados con 500 μ g de MLT/ Kg. de peso, a diferentes periodos p.i. ^a $p < 0,05$ con respecto al grupo control. ^b $p < 0,001$ con respecto al grupo control, ^c $p < 0,05$ con respecto al grupo de MLT, ^d $p < 0,001$ con respecto al grupo EEV.

Los niveles de IL-1 β se encontraron aumentados en los cerebros de ratones infectados con EEV los días 1-5 p.i, comparados con el grupo de animales control. La MLT no afectó los niveles de IL-1 β en los animales no infectados. Sin embargo, en los animales infectados tratados con MLT se observó un impresionante incremento de IL-1 β ($p < 0,01$) los días 1, 3, 4 y 5 p.i. (Figura 8).

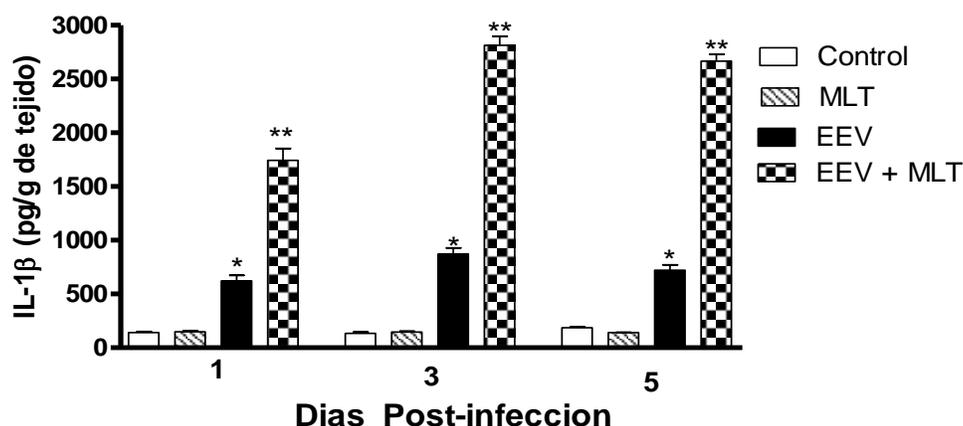


Figura 8.- Concentraciones de IL-1 β en Homogeneizados Cerebrales de ratones infectados con el Virus de la Encefalitis Equina Venezolana tratados con 500 μ g de MLT/kg de peso, a diferentes períodos post infección. * $p < 0,001$ con respecto al Control y MLT; ** $p < 0,001$ con respecto al resto de los grupos.

En la Figura 9 se observan los niveles séricos de IL-1 β en ratones infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana y tratados con MLT. Las concentraciones de este grupo aumentaron significativamente ($p < 0,001$) con respecto al resto de los grupos estudiados, desde el primer día post infección.

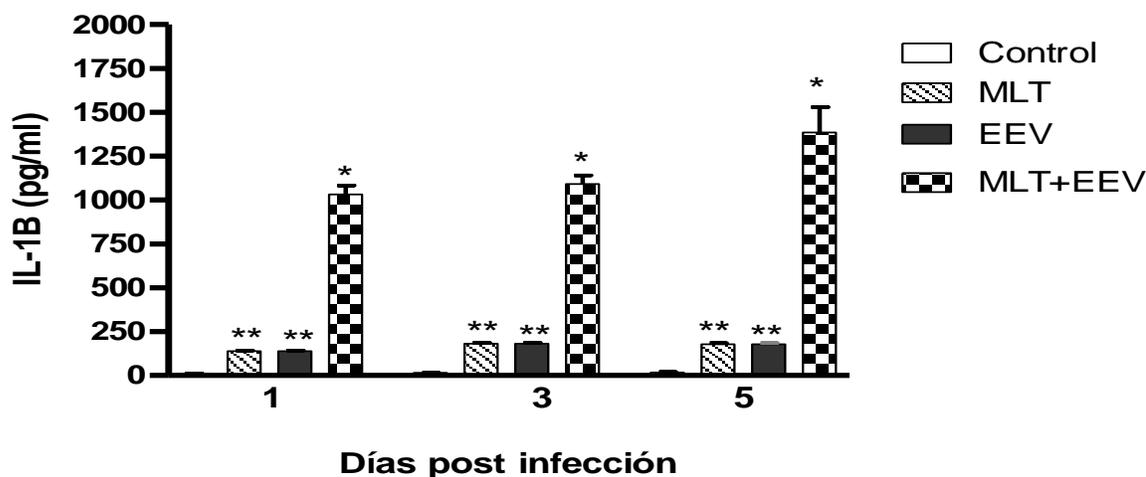


Figura 9.-Concentraciones de IL-1 β en el suero de ratones infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana tratados con 500 μ g de Melatonina/kg de peso a diferentes períodos post infección. * $p < 0,001$ con respecto al resto de los grupos. ** $p < 0,01$ con respecto al control.

Evaluación del efecto del tratamiento con MLT en la eficiencia de la inmunización de ratones con la cepa TC-83 del virus de la EEV

El día 14 después de la vacunación se observó un incremento ($p < 0,05$) de los títulos de anticuerpos anti EEV en los ratones tratados con dosis múltiples de MLT (1 mg/Kg.) al compararlos con el grupo de ratones control (1:6.720 vs. 1:680). Así mismo, cuando fueron tratados con 5 mg/Kg. de MLT se evidenció aumento de los títulos (1:5.280 vs. 1:1.760) durante la primera semana después de la inmunización (Figura 10).

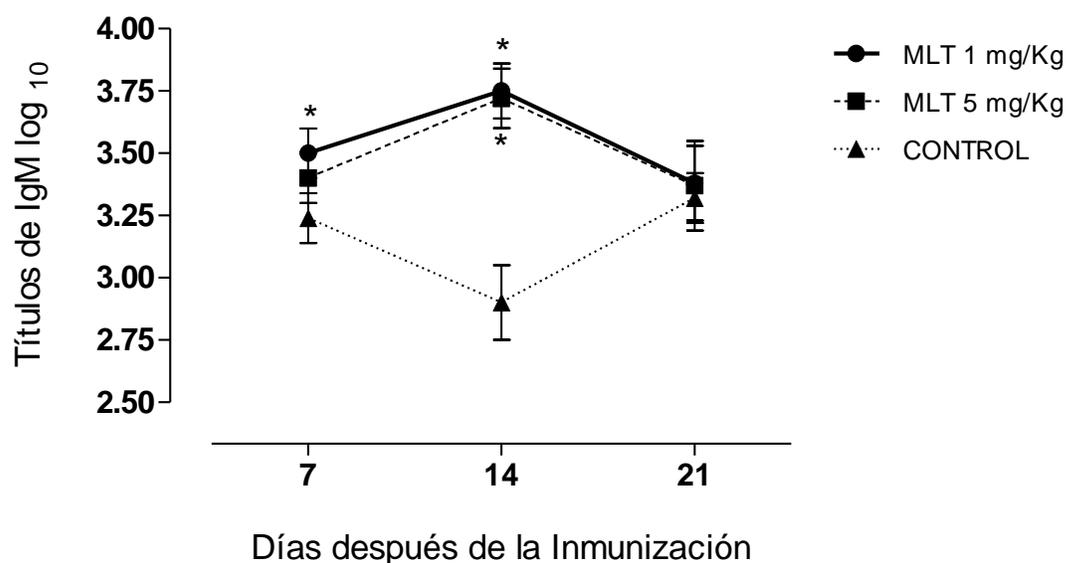


Figura 10. Respuesta de anticuerpos contra el virus de la EEV después de la vacunación con la cepa TC-83 en ratones tratados con MLT. Comparación de los promedios de títulos de IgM en ratones tratados con dosis múltiples (1 o 5 mg/ Kg. de peso) y con ratones no tratados. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control.

Cuando se determinaron los niveles de IL-10 en los ratones tratados con MLT el día 14 post vacunación, se observó un incremento significativo ($p < 0,01$) en los ratones tratados con 1 mg/Kg. de MLT ($92,3 \pm 25,64$ pg/ml vs. $10,7 \pm 5,86$ pg/ml en controles) y con 5 mg/Kg. de MLT ($143,6 \pm 12,82$ pg/ml vs. $10,7 \pm 5,86$ pg/ml en los controles) (Figura 11).

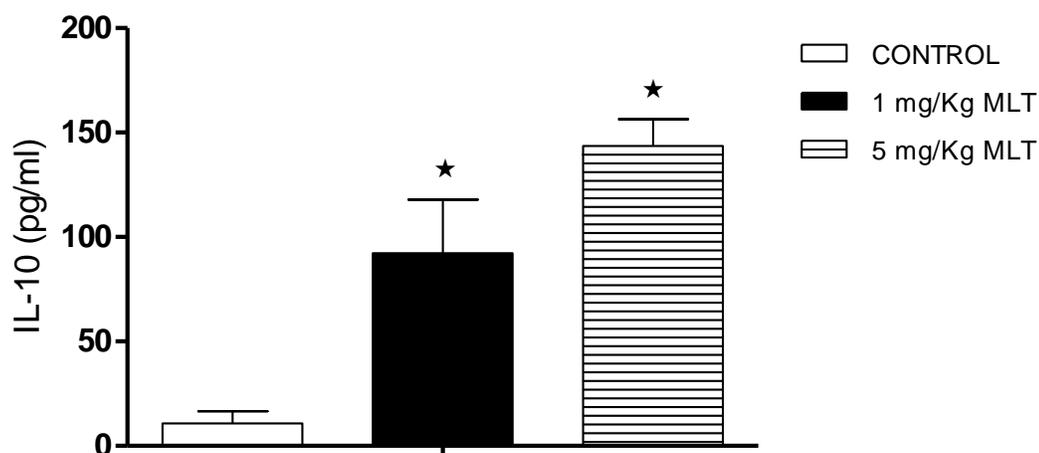


Figura 11. Efecto de la MLT en los niveles de IL -10 en ratones vacunados con la cepa TC-83 del virus de la EEV, el día 14 post vacunación. * $p < 0,05$ comparados con el grupo control.

Los niveles de virus en los cerebros de ratones infectados tratados con MLT (1 y 5 mg/Kg.), disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) comparados con los ratones infectados no tratados en el día 3 ($6,857$ y $6,850$ vs. $7,290$ \log_{10} UFP/g).

Determinación de las concentraciones de ON en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos múridos infectados con el virus de EEV, tratados o no tratados con MLT.

Se determinó un incremento significativo ($p < 0,05$) de las concentraciones de óxido nítrico en esplenocitos infectados con el virus de EEV ($162,45 \pm 28,53$ mmol/l; $178,96 \pm 27,53$ mmol con PHA), con respecto al grupo control. Se observó disminución significativa ($p < 0,05$) de los valores de ON en los esplenocitos infectados tratados con $100 \mu\text{g/ml}$ de MLT ($120,01 \pm 21,58$ mmol/l; $124,81 \pm 13,37$ mmol/l con PHA) (Figura 12).

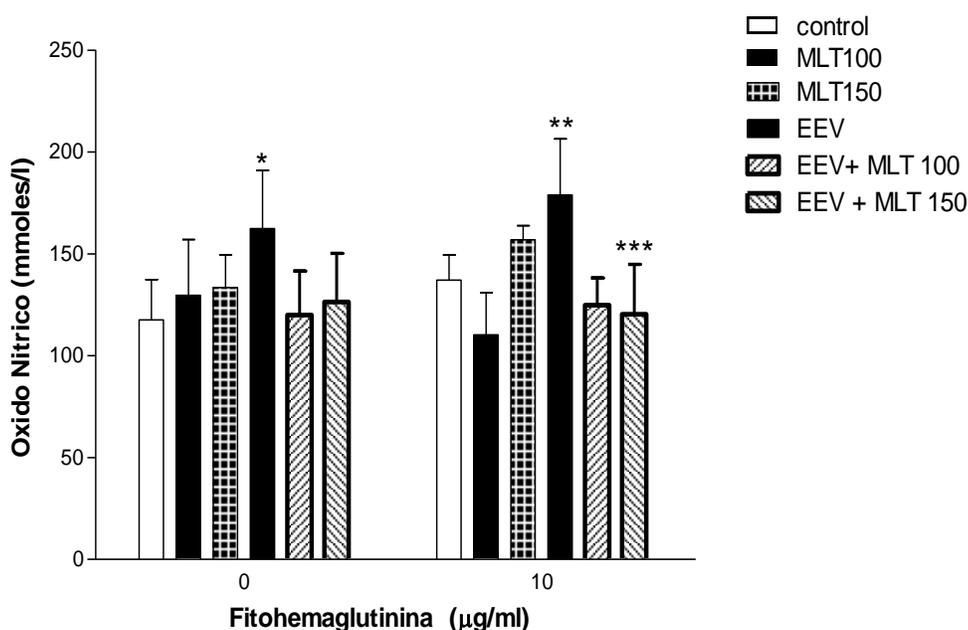


Figura 12. Niveles de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de esplenocitos de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana y tratados con 100 y $150 \mu\text{g/ml}$ de MLT. * $p < 0,05$ con respecto al grupo control, ** $p < 0,05$ con respecto a los grupos control, MLT 100 y EEV + MLT 100, *** $p < 0,05$ con respecto a los grupos EEV y MLT 150.

Determinación de las concentraciones de óxido nítrico en suero y cerebro de ratones infectados con el virus de EEV, tratados o no tratados con MLT.

En los ensayos *in vivo* las concentraciones de nitritos mostraron un significativo aumento ($p < 0,001$) en el grupo de ratones infectados: EEV ($X \pm DE$: $141,5 \pm 1,263 \mu\text{M}$) hacia el tercer día p.i. en relación a los grupos restantes, que se mantiene hasta el día 5. A su vez, en el grupo no infectado tratado con MLT se observó una disminución marcada ($p < 0,01$) de los nitritos en el suero durante los días 1, 3 y 5 p.i., ($58,46 \pm 5,35$; $52,93 \pm 5,83$ y $59,31 \pm 8,59 \mu\text{M}$, respectivamente) con respecto a los controles ($80,97 \pm 2,79$; $83,09 \pm 3,18$; $81,37 \pm 4,43 \mu\text{M}$). Los valores séricos de nitritos en el grupo de ratones infectados y tratados con MLT (MLT+EEV) disminuyeron ($p < 0,01$) a partir del tercer y hasta el quinto día p.i. ($66,95 \pm 5,37$; $76,30 \pm 2,94 \mu\text{M}$) con respecto al grupo infectado (EEV) (Figura 13).

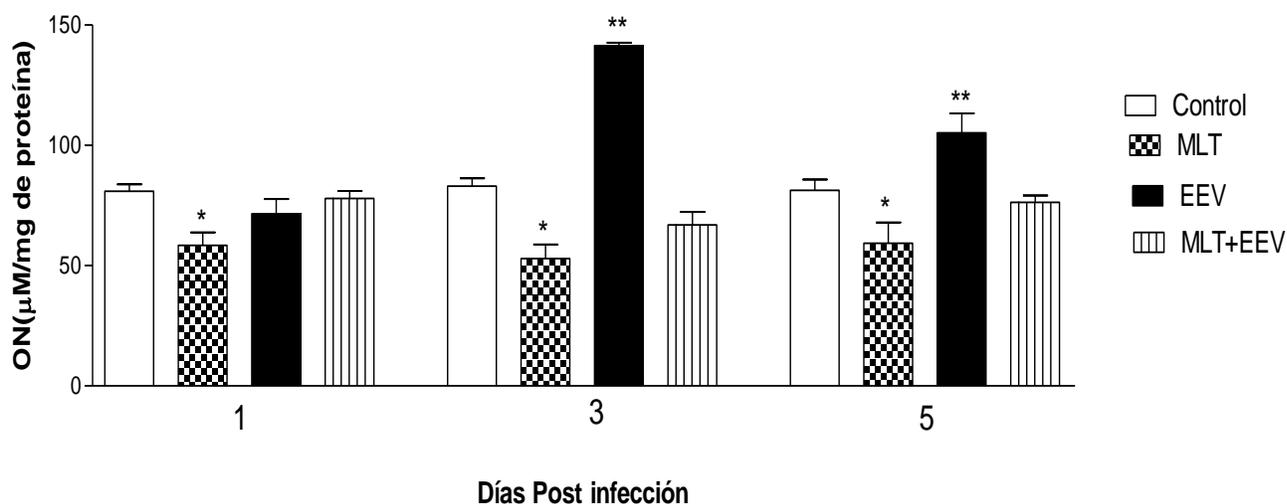


Figura 13.- Concentraciones de Nitritos en el suero de ratones infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana tratados con Melatonina. * $p < 0,01$ con respecto al control, ** $p < 0,001$ con respecto a los grupos restantes.

En los homogeneizados cerebrales, las concentraciones de nitritos fueron mayores que las observadas en suero. En el grupo de animales infectados no tratados (EEV) se obtuvieron valores incrementados ($p < 0,01$) desde el primero hasta el quinto día p.i. ($825,8 \pm 19,45$; $879,5 \pm 68,8$; $927,4 \pm 86,8 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al grupo control ($463,3 \pm 18,16$; $429,7 \pm 20,3$; $460,7 \pm 42,13 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). Con relación al grupo tratado con MLT las concentraciones de nitritos fueron significativamente mayores ($p < 0,001$) ($910,0 \pm 13,8$; $837,8 \pm 44,1$; $768,3 \pm 23,5 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) a las obtenidas en los animales control; disminuyendo hacia el quinto día p.i. en el cual, las concentraciones de nitritos fueron menores ($p < 0,01$) que las del grupo infectado con EEV. En los ratones infectados y tratados con MLT, a pesar de observarse valores mayores ($p < 0,001$) que los controles durante todo el ensayo, las concentraciones de nitritos disminuyeron ($p < 0,01$) desde el primer día p.i. ($684,7 \pm 19,5$; $684,0 \pm 78,5$; $752,2 \pm 44,7 \mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína) con respecto al grupo de ratones infectados no tratados (Figura 14).

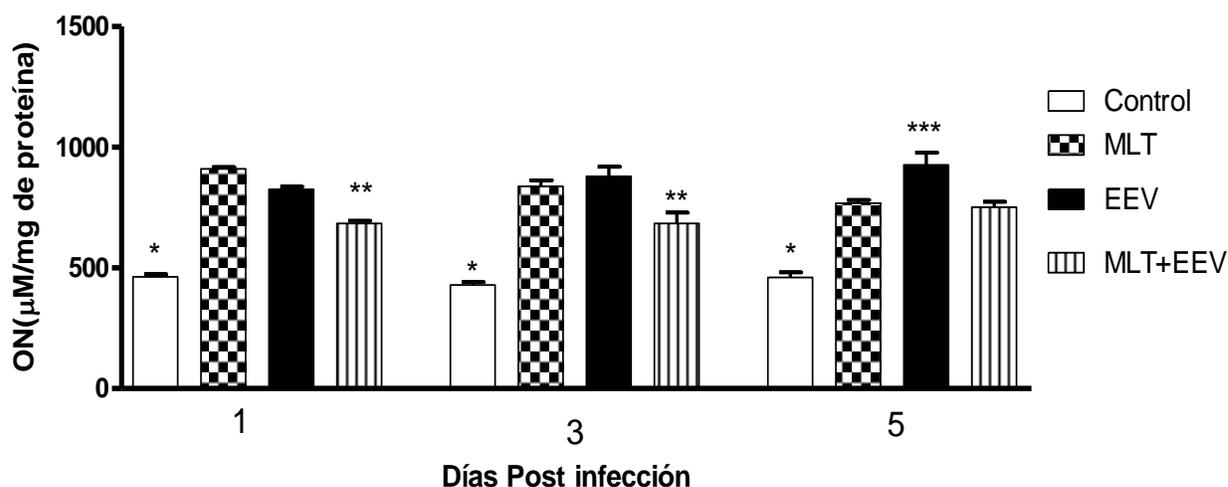


Figura 14.- Concentraciones de Nitritos en Homogeneizados Cerebrales de ratones infectados con el Virus de la Encefalitis Equina Venezolana tratados con MLT. $p < 0,001$ con respecto al resto de los grupos, ** $p < 0,001$ con respecto a MLT y EEV, *** $p < 0,01$ con respecto a MLT y MLT+EEV

Determinación de las concentraciones de Malondialdehído en suero y cerebro de ratones infectados con el virus de EEV, tratados o no tratados con MLT.

Las concentraciones séricas de MDA no arrojaron diferencias estadísticas entre los grupos ensayados y durante los días 1, 3 y 5 p.i. (Figura 15).

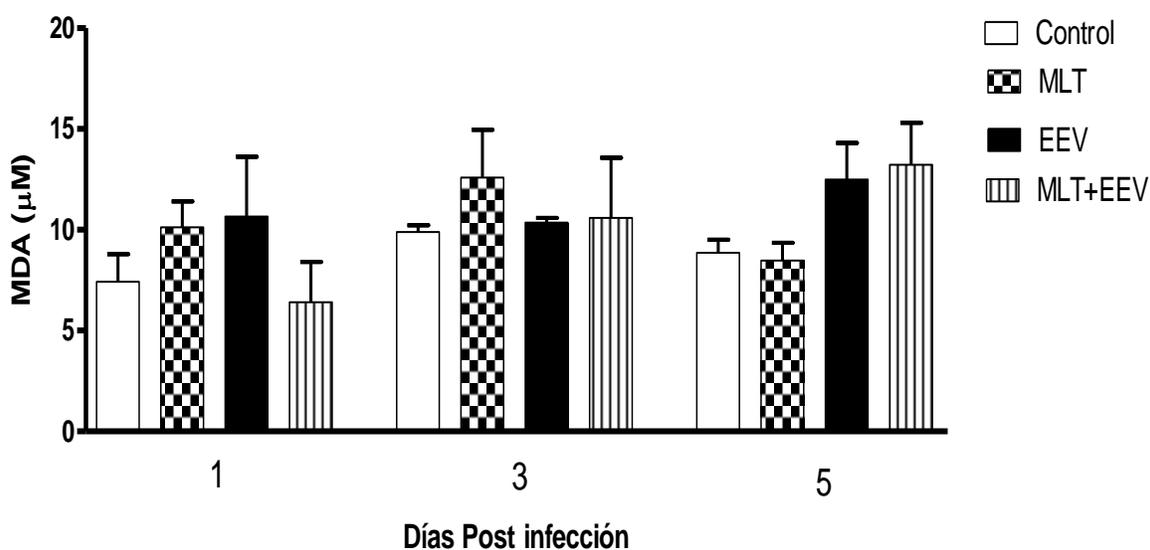


Figura 15.-Concentraciones de Malondialdehído en suero de ratones infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana tratados con Melatonina

Los niveles de MDA en homogenizados cerebrales, al igual que los nitritos también fueron elevados con respecto a los séricos, pero no se observaron cambios hasta el quinto día pi., en el cual los ratones infectados mostraron valores elevados ($p < 0,01$) con respecto al resto de los grupos ($527,2 \pm 60,77$ Vs. Control: $409,1 \pm 53,3$; MLT: $324,4 \pm 20,1$; MLT+EEV: $345,5 \pm 14,3$ nM/mg de proteína) (Figura 16).

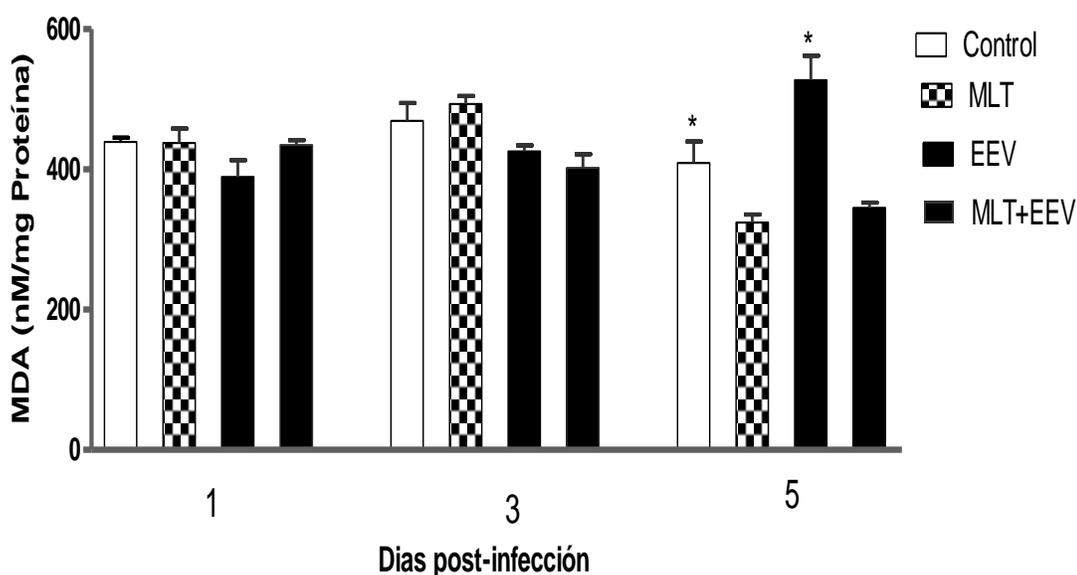


Figura 16.- Concentraciones de Malondialdehído en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana tratados con Melatonina. * $p < 0,01$ con respecto a los grupos restantes

Determinación de las concentraciones de Óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de células de Neuroblastoma múrido infectadas con el virus de EEV, tratadas o no con MLT.

In vitro, a las 6 horas p.i., no se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de nitritos en los sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma múrido infectadas con EEV y tratadas con diferentes dosis de MLT (Figura 17).

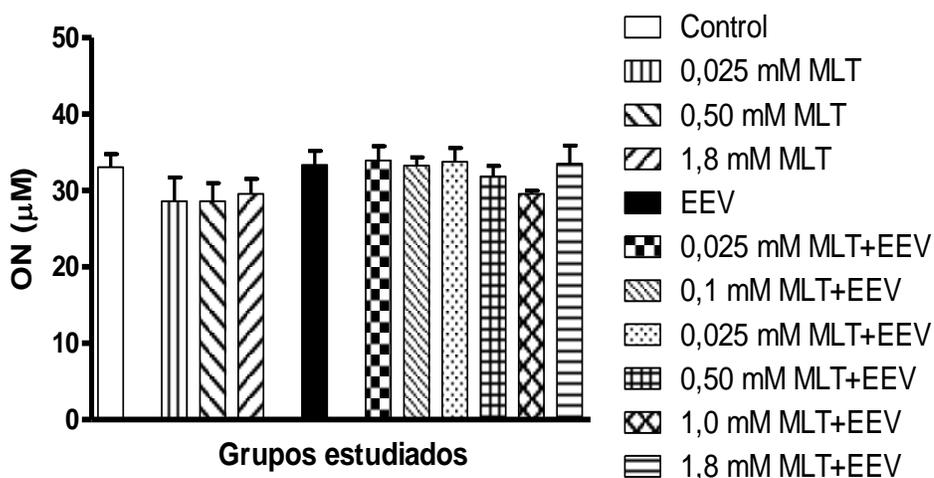


Figura 17.-Concentraciones de Nitritos en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 6 horas post-infección.

A las 12 horas p.i., se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la producción de nitritos en los grupos infectados con EEV y tratados con MLT a dosis de 0,1mM ($25,32 \pm 1,98 \mu\text{M}$); 0,5mM ($22,23 \pm 3,2 \mu\text{M}$) y 1,0 mM ($26,16 \pm 1,8 \mu\text{M}$) (Figura 18).

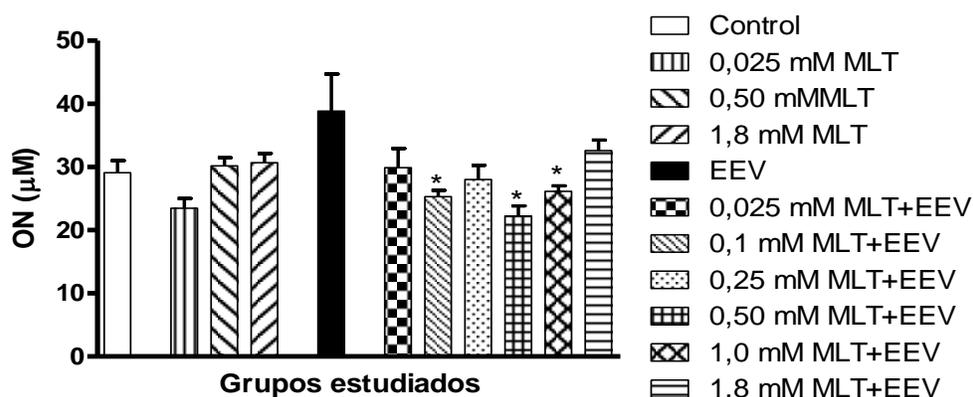


Figura 18.-Concentraciones de Nitritos en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 12 horas post-infección. * $p < 0,05$ con respecto a EEV.

A las 24 horas p.i., en los grupos infectados y tratados con MLT se obtuvieron concentraciones de nitritos muy bajas ($p < 0,001$) con todas las dosis ensayadas (0,025mM: $14,61 \pm 3,32$; 0,1mM: $12,22 \pm 1,74$; 0,25mM: $13,37 \pm 3,23$; 0,5mM: $12,09 \pm 0,83$; 1,0mM: $13,28 \pm 1,45$; 1,8mM: $13,42 \pm 0,90 \mu\text{M}$) con respecto a los grupos Control ($32,16 \pm 6,59 \mu\text{M}$); MLT (0,025mM: $24,61 \pm 2,68$; 0,5mM: $25,78 \pm 0,83$ y 1,8mM: $26,06 \pm 2,28 \mu\text{M}$) y EEV ($36,61 \pm 5,85 \mu\text{M}$) (Figura 19).

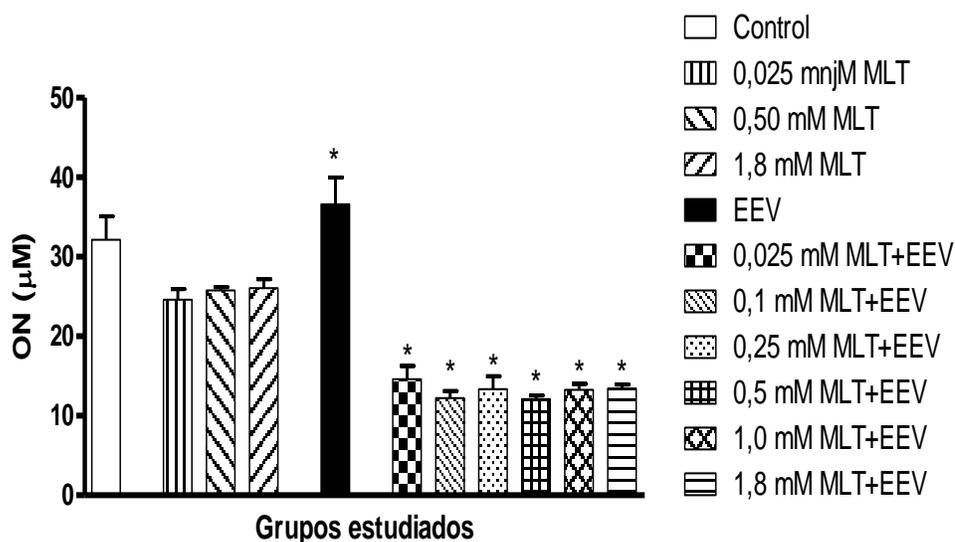


Figura 19.- Concentraciones de Nitritos en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma mÚrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 24 horas post-infecci3n. * $p < 0,001$ con respecto al Control, MLT y EEV

Mientras que a las 48 horas p.i., se observ3 un patr3n similar, pero con un incremento significativo de las concentraciones de nitritos ($p < 0,001$) en el grupo infectado ($57,96 \pm 10,8 \mu\text{M}$) con respecto al resto de los grupos: Control: $36,74 \pm 8,47 \mu\text{M}$; MLT (0,025mM: $24,79 \pm 2,9$; 0,5mM: $30,68 \pm 5,47$ y 1,8mM: $26,92 \pm 3,39 \mu\text{M}$) y MLT+EEV en todas las dosis (Figura 20).

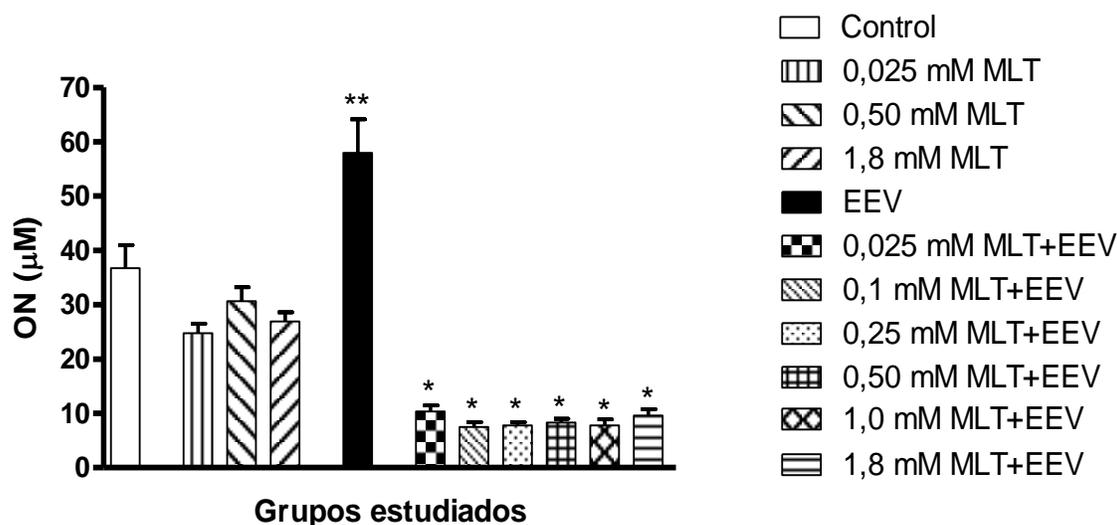


Figura 20.-Concentraciones de Nitritos en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina de infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana las 48 horas post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al Control, MLT y EEV ; ** $p < 0,001$ con respecto a los grupos restantes

Determinación de las concentraciones de Óxido nítrico en cultivo de células de neuroblastoma múrido infectados con el virus de EEV, tratados o no con MLT.

Al observar los valores de nitritos en células de neuroblastoma múrido infectadas con EEV y tratadas con diferentes dosis de MLT a las 6 horas p.i. (Figura 21), se puede notar que existen diferencias significativas ($p < 0,01$) de los grupos de EEV ($30,50 \pm 1,60 \mu\text{M}$) y los cultivos infectados tratados con MLT (0,025mM: $24,84 \pm 6,59$; 0,1mM: $27,71 \pm 1,8$; 0,25mM: $27,07 \pm 4,24$; 0,5mM: $27,55 \pm 0,63$; 1,0mM: $28,57 \pm 3,72$; 1,8mM: $31,37 \pm 2,89 \mu\text{M}$) con respecto al Control ($8,18 \pm 1,27 \mu\text{M}$) y a los grupos celulares no infectados tratados con MLT (0,025mM: $13,05 \pm 0,40$; 0,5mM: $12,74 \pm 2,41$; 1,8mM: $12,30 \pm 2,58 \mu\text{M}$).

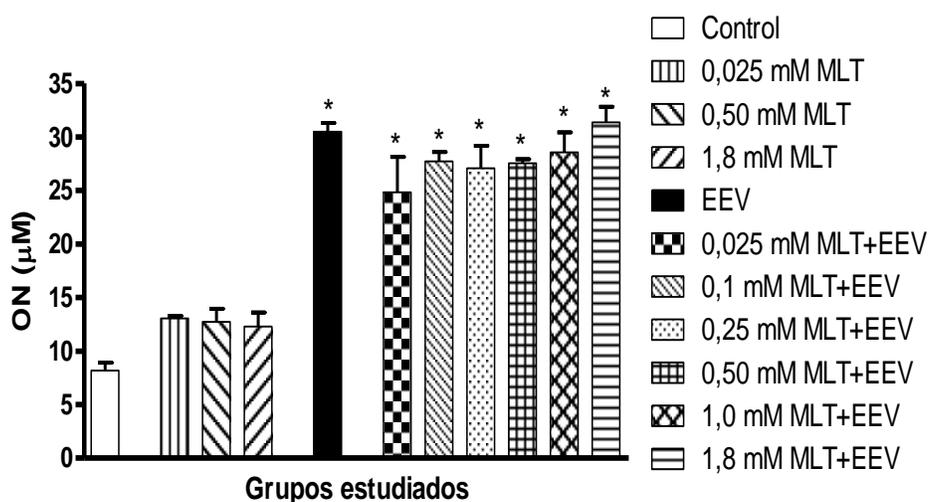


Figura 21.- Concentraciones de Nitritos en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 6 horas post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al Control y MLT

A las 12, 24 y 48 horas p.i., no se observaron cambios importantes en las concentraciones de nitritos en las células de neuroblastoma tratadas con MLT, así como tampoco en el grupo infectado con EEV, ni en los grupos infectados y tratados con MLT en relación con sus controles (Figuras 22, 23 y 24).

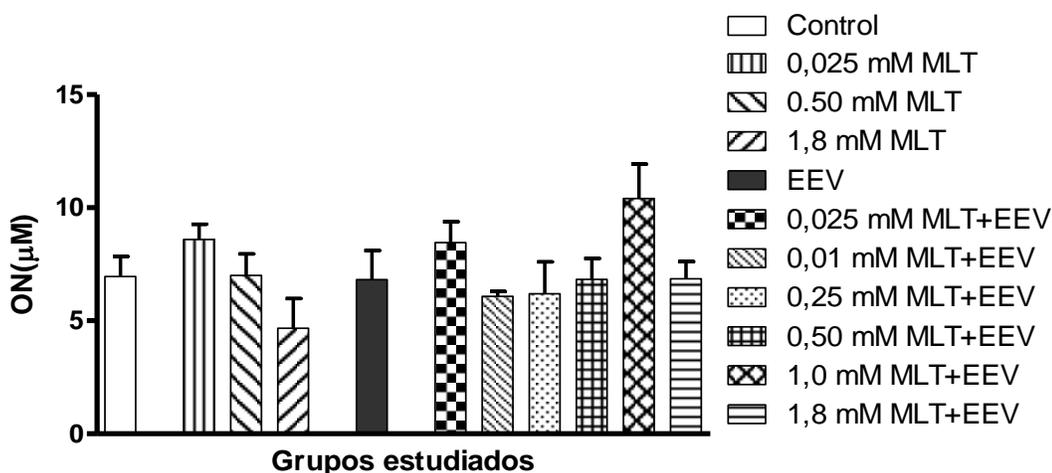


Figura 22.-Concentraciones de Nitritos en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 12 horas post-infección.

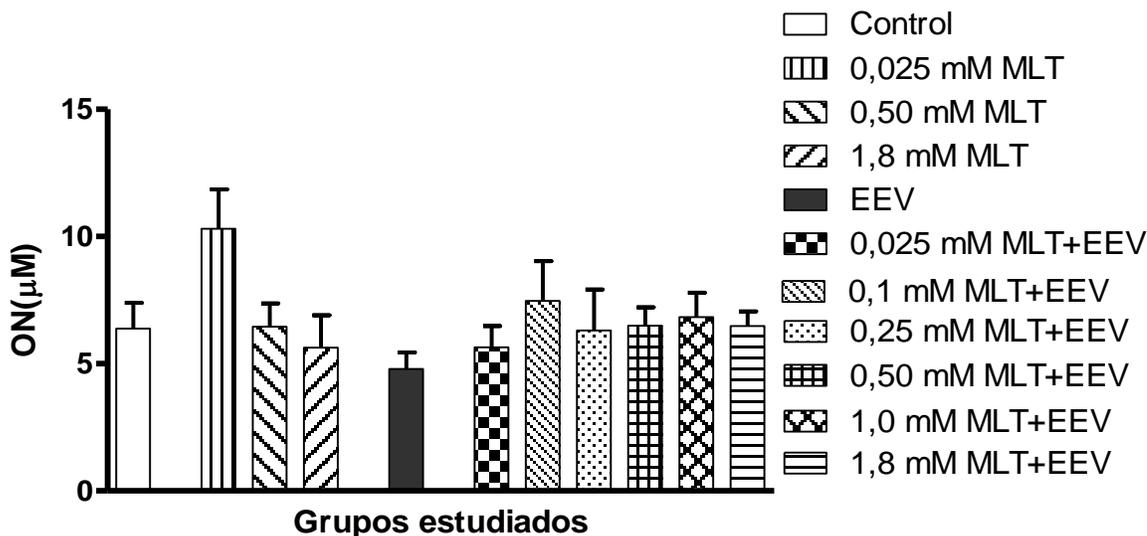


Figura 23.-Concentraciones de Nitritos en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 24 horas post-infección

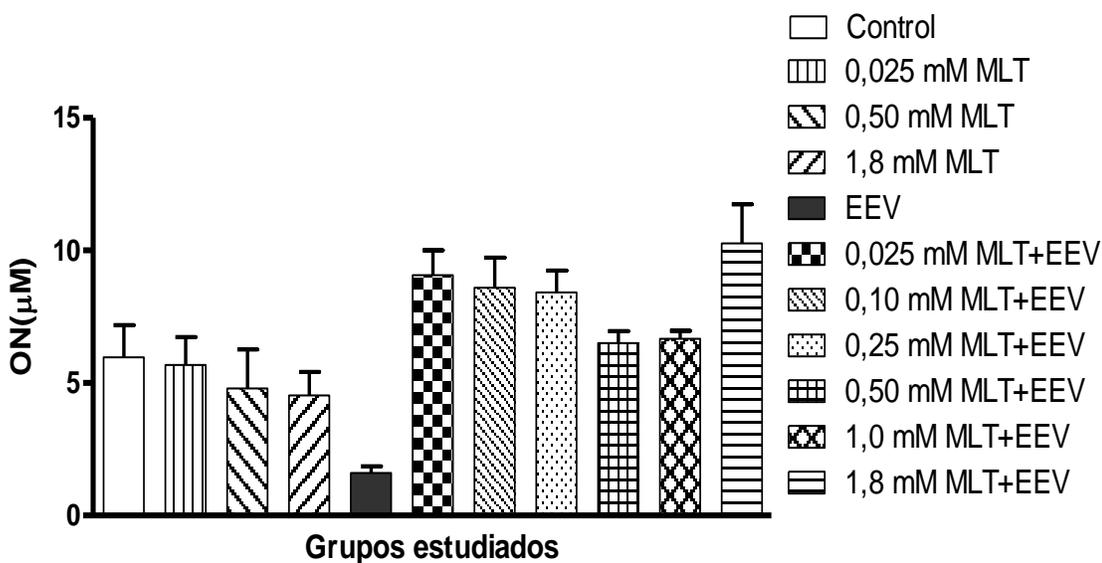


Figura 24.-Concentraciones de Nitritos en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 48 horas post-infección

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

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

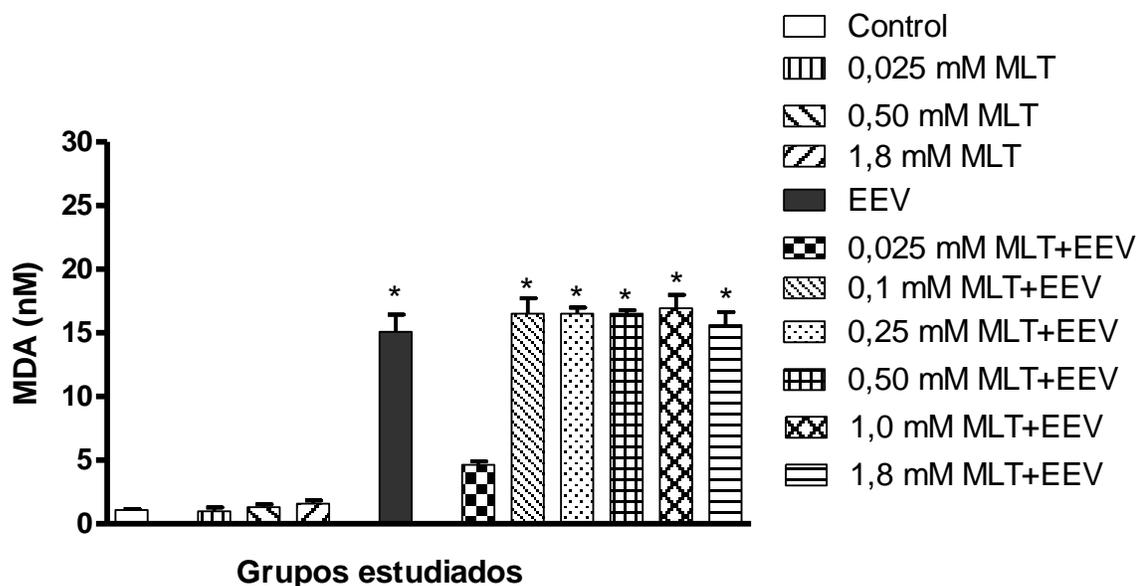


Figura 25.-Concentraciones de Malondialdehído en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrdo tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 6 horas post-infección. * $p < 0,01$ con respecto al Control, MLT y 0,025 mM MLT+EEV

A las 12 horas p.i., se observó que se mantiene el mismo patrón de las seis horas, pero en los sobrenadantes de cultivos infectados no tratados (EEV: 30,33±5,03 nM) se detectó un incremento importante ($p<0,001$) en las concentraciones de MDA con respecto a los sobrenadantes de los grupos restantes: Control (3,24±0,72 nM); MLT (0,025mM: 0,87±0,20nM; 0,50mM: 1,96±0,86nM 1,8mM: 2,64±0,64nM); MLT+EEV (0,025mM: 14,56±3,52; 0,1mM: 13,02±2,8; 0,25mM: 13,56±2,8; 0,5mM: 16,04±0,61; 1,0mM: 13,91±2,08; 1,8mM: 14,90±3,12 nM) (Figura 26).

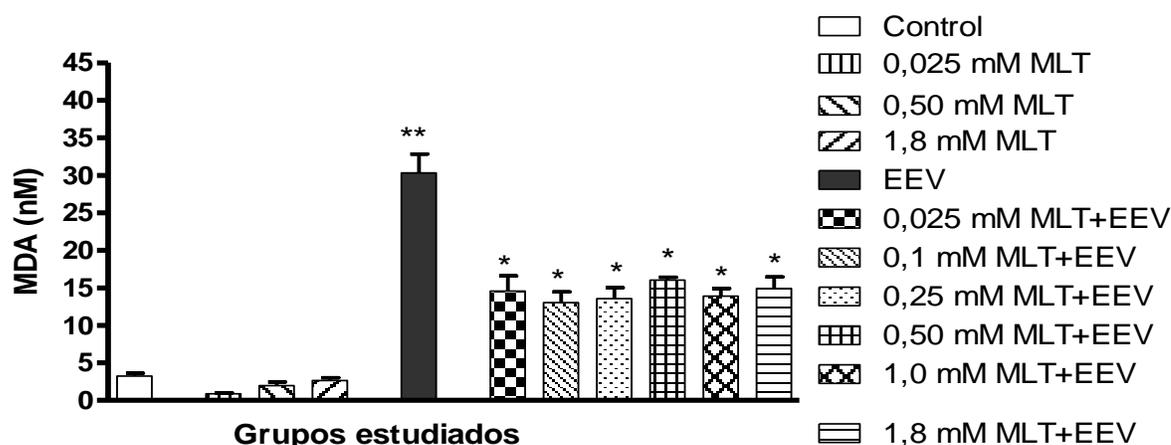


Figura 26.-Concentraciones de Malondialdehído en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma mÚrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 12 horas post-infección. * $p<0,001$ con respecto al Control, MLT y EEV, ** $p<0,001$ con respecto a los grupos restantes

se destaca un marcado y significativo ($p<0,0001$) aumento en la producción de MDA a las 24 horas p.i., en los sobrenadantes de cultivos de células de neuroblastoma infectadas no tratadas con MLT (41,34±7,20nM) en relación con el control (2,01±0,69nM), los cultivos no infectados tratados (MLT: 0,0025mM: 0,36±0,25; 0,5mM: 1,21±0,20; 1,8mM: 1,04±0,13 nM) y en los infectados tratados con MLT (0,0025mM: 10,89±3,05; 0,1mM: 9,44±2,12; 0,25mM: 9,88±0,61; 0,50mM: 11,51±1,4; 1,0mM: 10,35±1,52; 1,8mM: 9,35±2,13nM) (Figura 27).

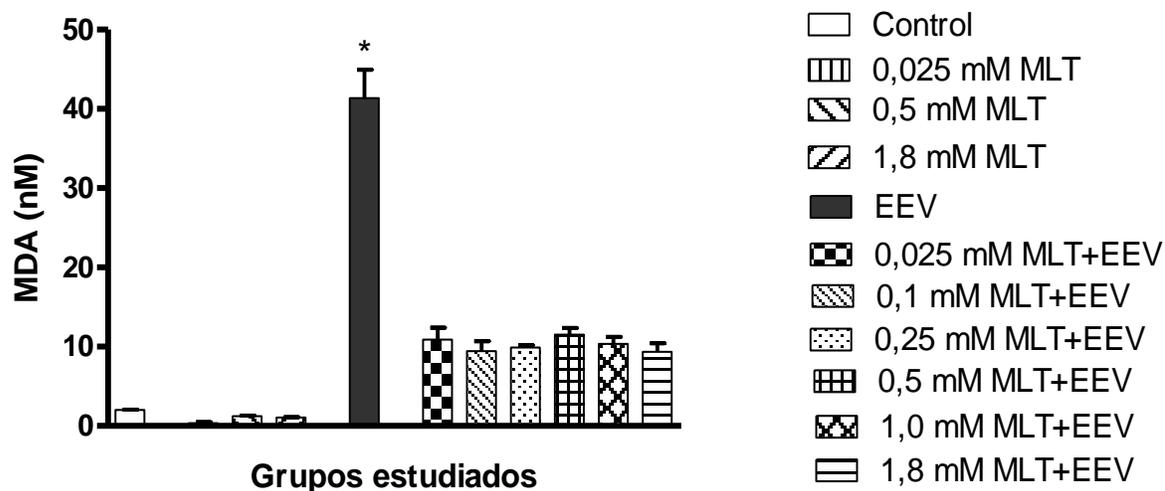


Figura 27.-Concentraciones de Malondialdehído en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 24 horas post-infección.

* $p < 0,0001$ con respecto a los grupos restantes.

A las 48 horas p.i., se mantienen concentraciones elevadas ($p < 0,0001$) de MDA en el grupo infectado con EEV ($64,91 \pm 17,75$ nM) en relación con el Control y el resto de los grupos ensayados (Figura 28).

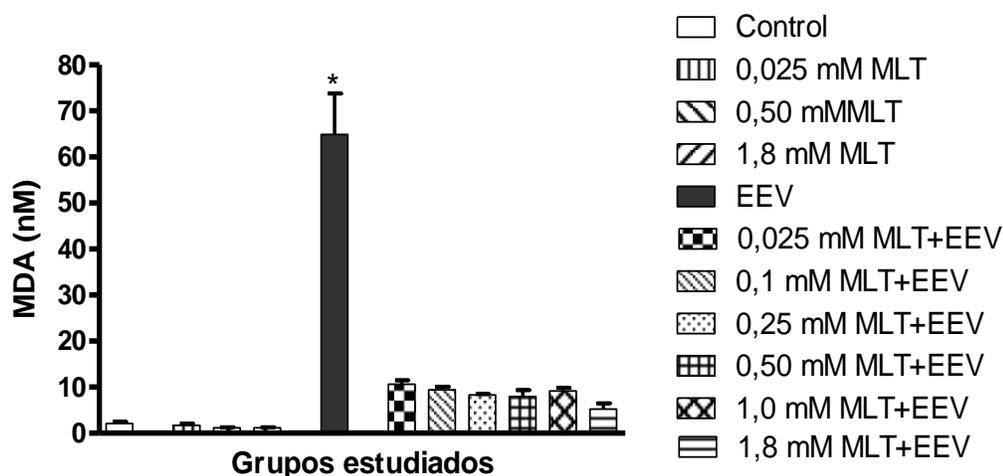


Figura 28.-Concentraciones de Malondialdehído en sobrenadantes de cultivos de neuroblastoma múrido tratados con Melatonina e infectados con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 48 horas post-infección. * $p < 0,0001$ con respecto a los grupos restantes

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

A las 6 horas p.i. se detectaron incrementos significativos ($p < 0,001$) de los niveles de MDA en los grupos infectados tratados (0,025mM: $14,14 \pm 0,67$; 0,1mM: $12,48 \pm 1,05$; 0,25mM: $16,94 \pm 0,63$; 0,5mM: $16,99 \pm 0,65$; 1,0mM: $16,39 \pm 2,72$; 1,8mM: $16,72 \pm 2,24$ nM), y no tratados (EEV: $13,80 \pm 0,85$ nM) en relación a los grupos Control ($1,45 \pm 0,7$ nM) y no infectados tratados con MLT (0,025mM: $1,49 \pm 0,47$; 0,50mM: $2,03 \pm 0,63$; 1,8mM: $1,5 \pm 0,23$ nM) (Figura 29).

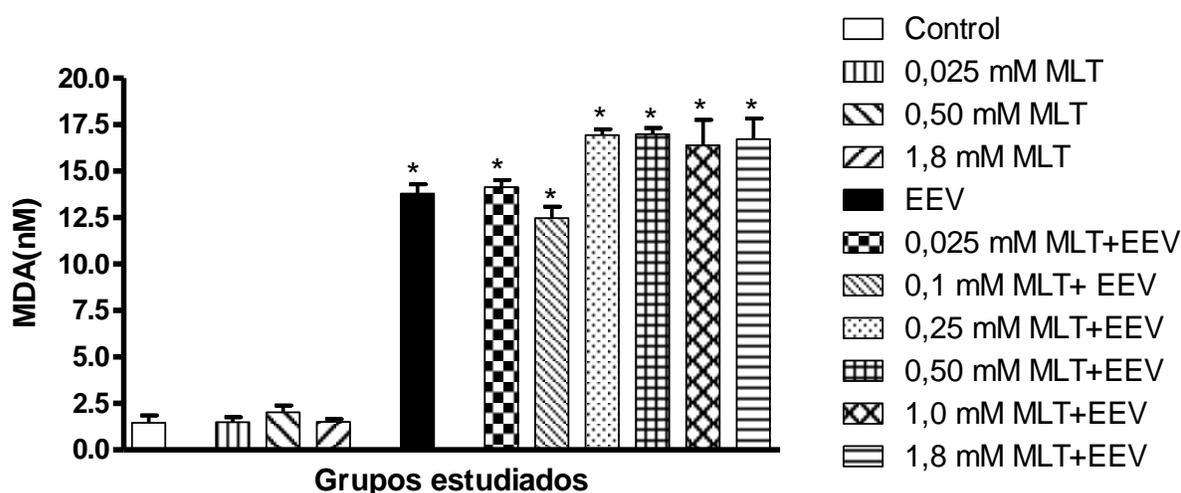


Figura 29.-Concentraciones de Malondialdehído en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 6 horas post-infección. * $p < 0,001$ con respecto al Control y MLT

Así mismo, a las 12 horas p.i. se observó un aumento significativo ($p < 0,001$) de las concentraciones de MDA del grupo infectado ($18,08 \pm 0,87$ nM) con respecto a los grupos Control ($4,63 \pm 0,20$ nM); MLT (0,025mM: $1,15 \pm 0,43$; 0,50mM: $1,60 \pm 0,69$; 1,8mM: $4,13 \pm 0,55$ nM); y MLT+EEV de 0,1mM, 0,25mM, 0,50mM, 1,0 mM y 1,8 mM ($13,77 \pm 0,23$; $12,82 \pm 3,23$; $13,47 \pm 2,72$; $12,16 \pm 2,77$; $12,41 \pm 0,37$ nM, respectivamente) (Figura 30).

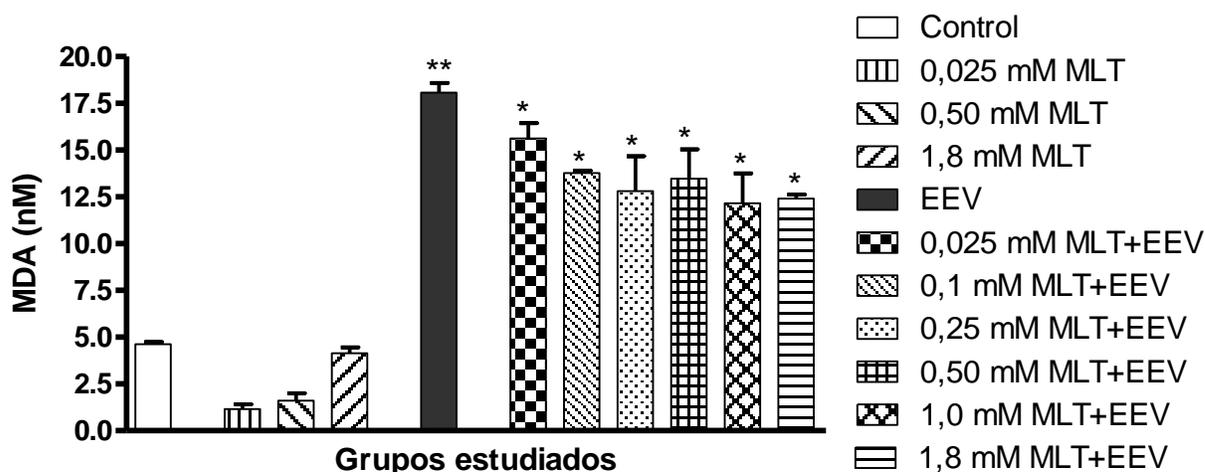


Figura 30.-Concentraciones de Malondialdehído en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 12 horas post-infección. * $p < 0,001$ con respecto al Control y MLT, ** $p < 0,001$ con respecto al Control, MLT y 0,1; 0,25; 0,50; 1,0 y 1,8 mM MLT+EEV

A las 24 y 48 horas p.i. se observa un patrón similar en cuanto a las concentraciones de MDA en los grupos. Se obtuvieron valores elevados ($p < 0,01$) en los grupos de células infectadas (EEV: $13,57 \pm 2,86$ nM) y en las infectadas tratadas (MLT+EEV) (0,0025mM: $10,13 \pm 0,97$; 0,1mM: $11,31 \pm 1,52$; 0,25mM: $12,82 \pm 0,5$; 0,50mM: $11,51 \pm 0,9$; 1,0mM: $8,95 \pm 1,60$; 1,8mM: $9,47 \pm 0,57$ nM) con respecto a los Control ($3,57 \pm 2,21$ nM) y los grupos no infectados tratados MLT (0,025mM: $5,80 \pm 0,46$; 0,50mM: $1,08 \pm 0,49$; 1,8mM: $1,55 \pm 0,57$ nM) a las 24 horas p.i. se observaron concentraciones similares a las 48 horas p.i. (Figuras 31 y 32).

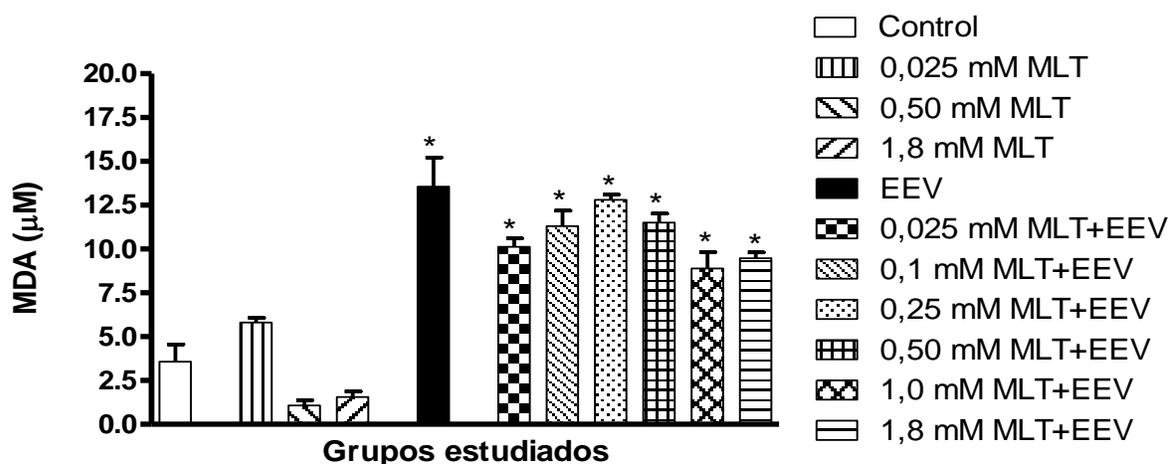


Figura 31.-Concentraciones de Malondialdehído en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 24 horas post-infección. * $p < 0,001$ con respecto al Control y MLT

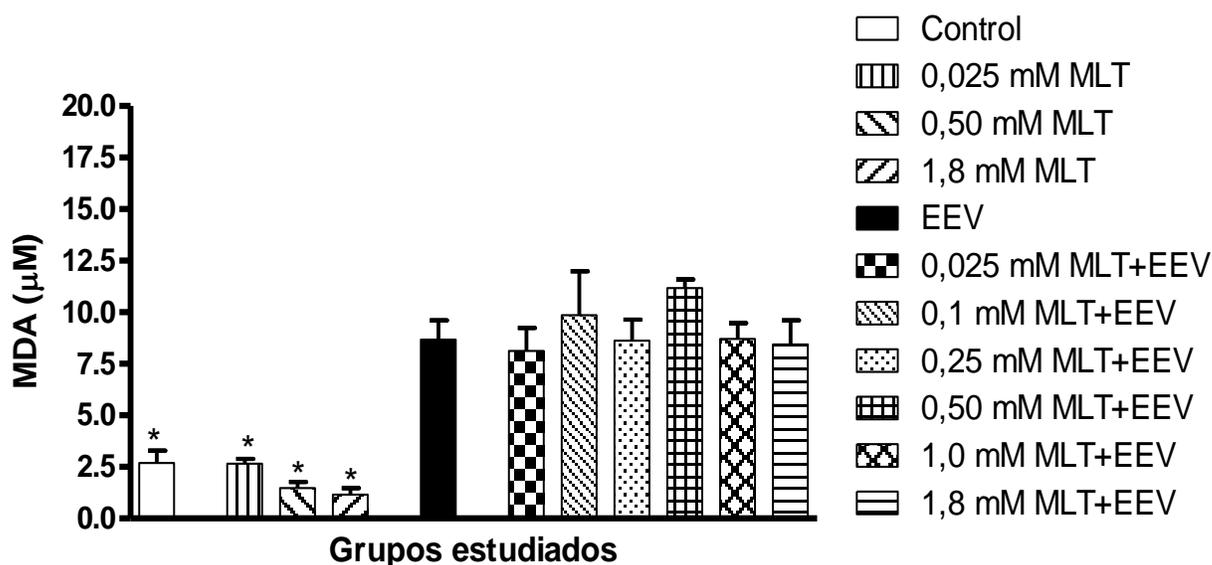


Figura 32.- Concentraciones de Malondialdehído en células de neuroblastoma tratadas con Melatonina e infectadas con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana a las 48 horas post-infección. * $p < 0,001$ con respecto a EEV y MLT+EEV en todas las dosis ensayadas

El cultivo de células de neuroblastoma múrido infectadas con el virus de EEV aumento la expresión de la oxido nítrico sintetasa inducible la cual fue disminuida significativamente ($p < 0,001$) por la acción de la MLT (Figuras 33 y 34)

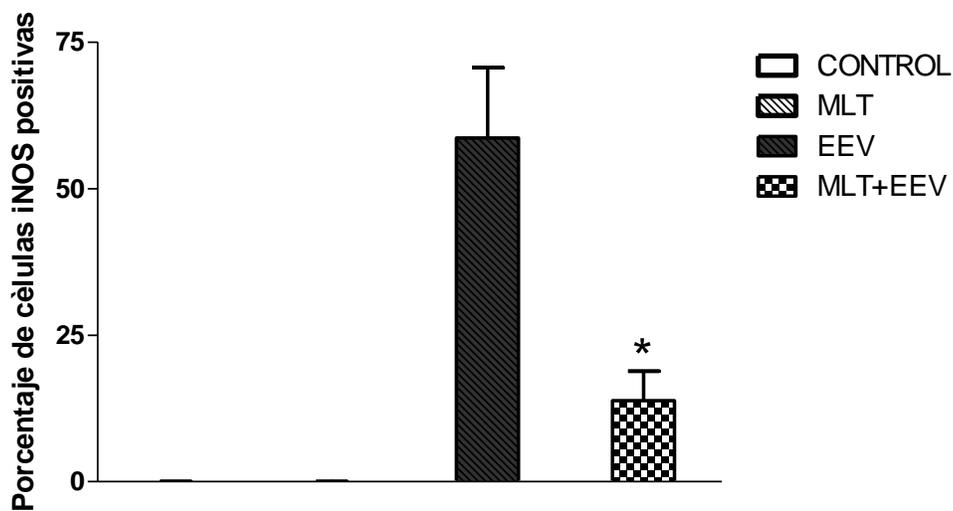


Figura 33.- Porcentaje de Células de neuroblastoma iNOS positivas tratadas con MLT (1mM) infectadas con el virus de EEV, a las 48 horas post infección. * $p < 0,001$ con respecto a EEV.

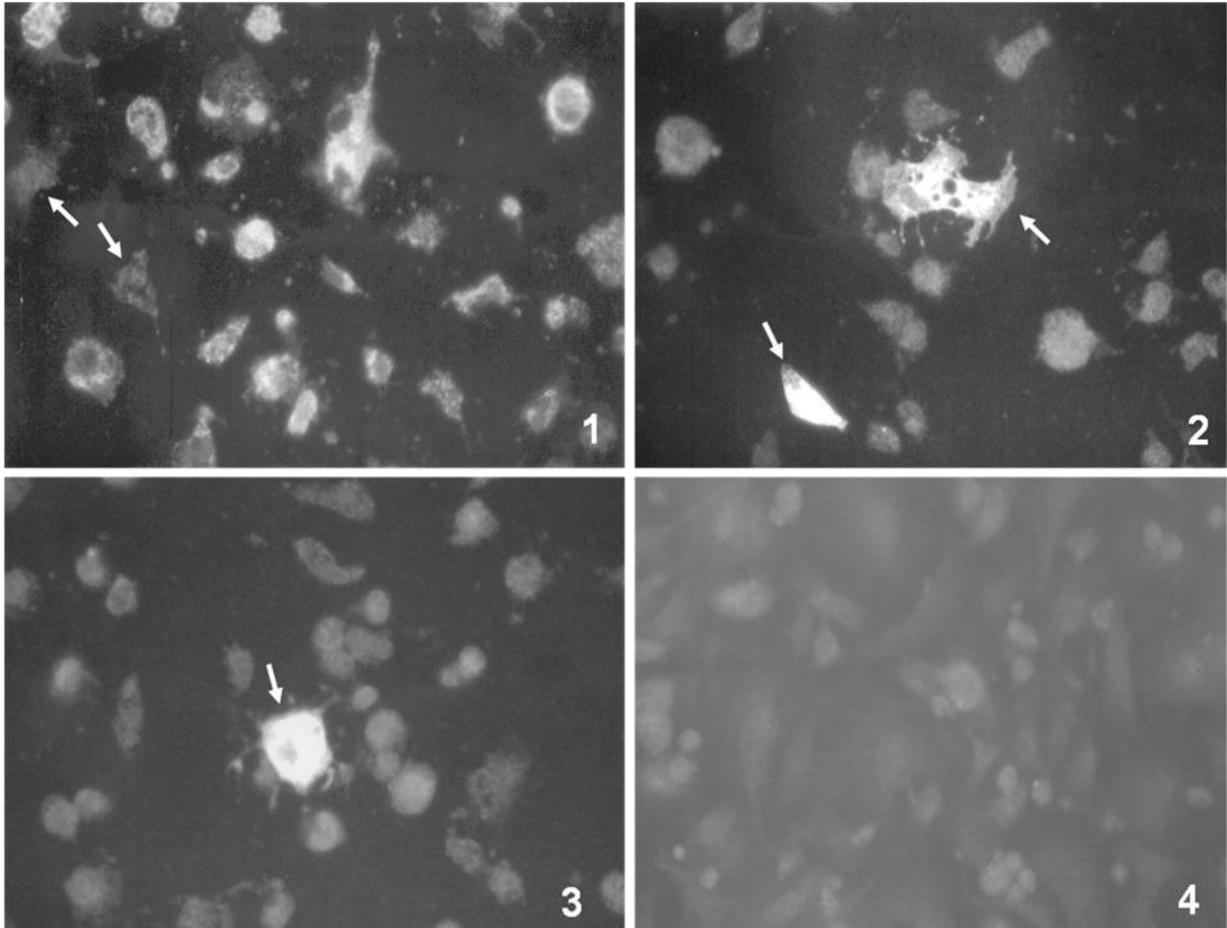


Figura 34. Expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en cultivo de células de neuroblastoma múrdo infectadas con el virus de EEV y tratadas con MLT, determinada por Inmunofluorescencia indirecta. Flechas en 1 indican células negativas y en las figuras 2 y 3 células positivas y 4 celulas tratads con MLT no infectadas (400 X).

Efecto antagonista del Luzindole sobre la tasa de sobrevida y títulos virales en suero y cerebro de ratones tratados con MLT e infectados con el virus de EEV

A los 6, 7 y 8 días después de la inoculación viral (10 DL₅₀ de EEV/ratón) la tasa de mortalidad en ratones tratados con 500µg/Kg. de MLT fue de 25% y 45% respectivamente ($p < 0,05$) con respecto al 55% y 100% de la mortalidad observada en el grupo control de ratones infectados (EEV). De igual manera al comparar el porcentaje de mortalidad en ratones tratados con MLT y pretratados con LZ a 2,5 (41,6%; 66,6%; 100%) y 5 mg/Kg. (58,3%; 74,9%; 100%), se refleja una diferencia significativa con una $p < 0,05$ al compararlo con el grupo de MLT+EEV (Figura 35).

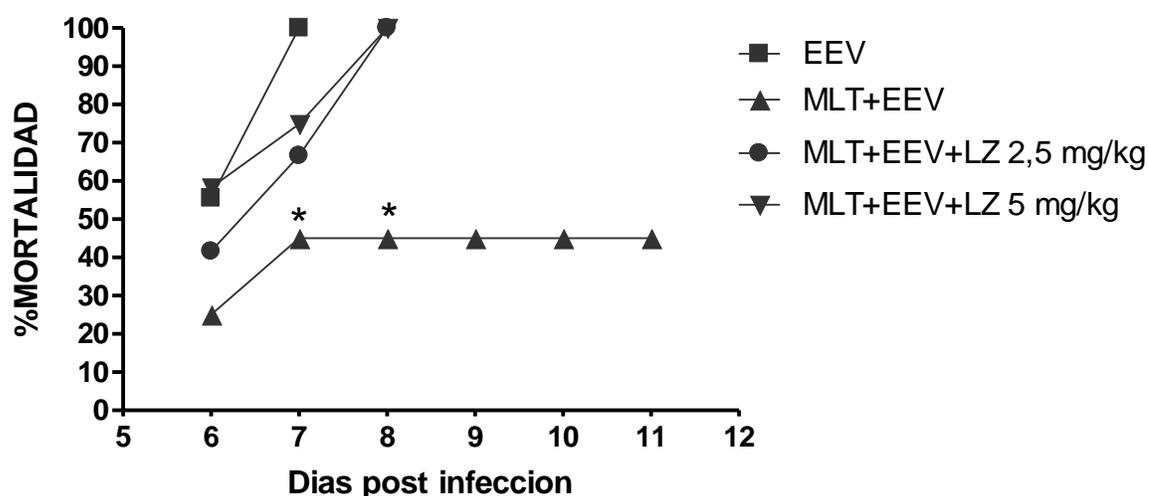


Figura 35.- Tasa de sobrevida en ratones infectados con el virus de EEV pretratados con MLT y Luzindole (LZ). * $p < 0,05$ con respecto a EEV; MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5mg/kg

Las tasa de mortalidad en los ratones tratados con 500 µg/Kg. de MLT y post-tratados con LZ a dosis de 2,5 (16,6%; 49,9%; 100%) y 5 mg/Kg. (16,6%; 66,6%; 100%), también fueron mayores ($p < 0,05$) que las observadas en el grupo de MLT+EEV (Figura 36).

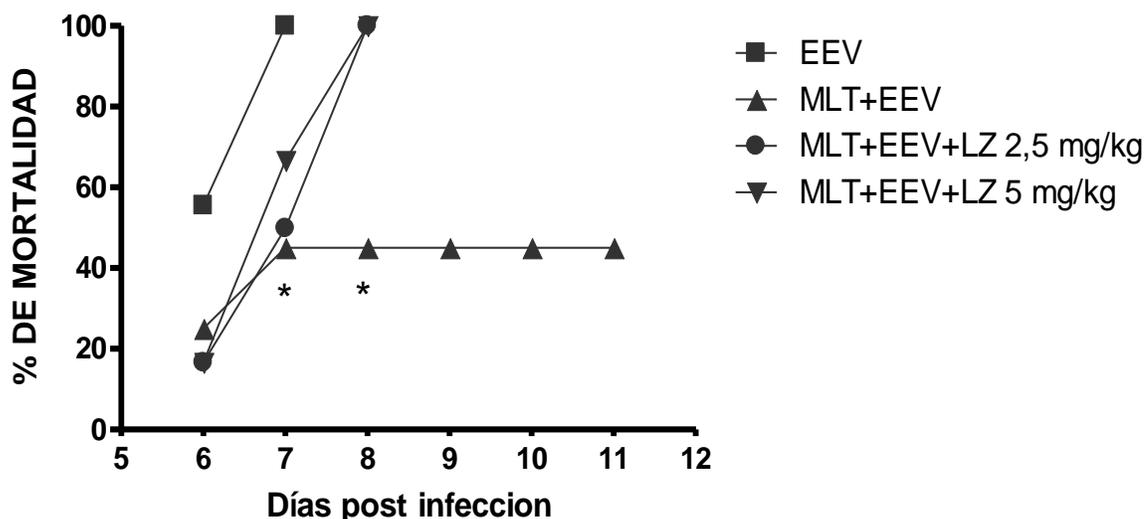


Figura 36.- Tasa de sobrevivencia en ratones infectados con el virus de EEV, pretratados con MLT y post-tratados con Luzindole (LZ). * $p < 0,05$ con respecto a EEV; MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg

Los títulos de 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.

Al evaluar los resultados obtenidos al 1^{er} día post infección se observó, en los sueros de los animales infectados con el virus de EEV, que los valores en los títulos ($33,666 \times 10^3 \pm 8,81 \times 10^2$ UFP/ml), fueron significativamente incrementados ($p < 0,05$) al compararlas con los grupos de MLT+EEV ($3,777 \times 10^3 \pm 1,388 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados 2,5 mg/Kg. ($8,222 \times 10^3 \pm 1,388 \times 10^3$ UFP/ml). En relación a los grupos de MLT+EEV+LZ pretratados con concentraciones de 2,5 mg/Kg. ($22,666 \times 10^3 \pm 4,371 \times 10^3$ UFP/ml); 5 mg/Kg. ($22,444 \times 10^3 \pm 9,436 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados con concentraciones 5 mg/Kg. ($19 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$ UFP/ML), se observó que los títulos de éstos se encontraron elevados ($p < 0,05$) al compararlos con los grupos de MLT+EEV y MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones de 2,5 mg/Kg. (Figura 37).

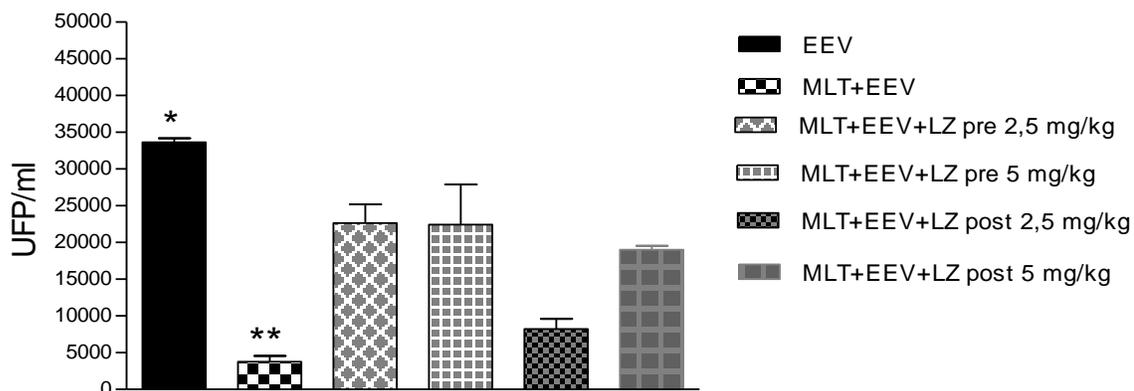


Figura 37.- Titulación Viral en suero de ratones infectados con el virus de EEV pre-tratados con MLT y pre/post-tratados con Luzindole (LZ) al 1^{er} día post-infección. * $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV y MLT+EEV+LZ post 2,5 mg/kg, ** $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg y MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg

Al igual que en el 1^{er} día p.i. los títulos virales se encuentran elevados. Los títulos observados fueron $33,333 \times 10^3 \pm 5,774 \times 10^2$ UFP/ml, siendo mayores ($p < 0,01$) que los detectados en los grupos de MLT+EEV ($3,777 \times 10^3 \pm 1,388 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados 2,5 mg/Kg. ($8,222 \times 10^3 \pm 1,388 \times 10^3$ UFP/ml). En los grupos de MLT+EEV+LZ pretratados a concentraciones de 2,5mg/Kg. ($25 \times 10^3 \pm 1,732 \times 10^3$ UFP/ml) y 5 mg/Kg. ($38,333 \times 10^3 \pm 4,726 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones de 5 mg/Kg. ($16,333 \times 10^3 \pm 4,726 \times 10^3$ UFP/ml), se determinaron títulos virales mayores ($p < 0,01$) que en los grupos MLT+EEV y MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones 2,5 mg/Kg (Figura 38).

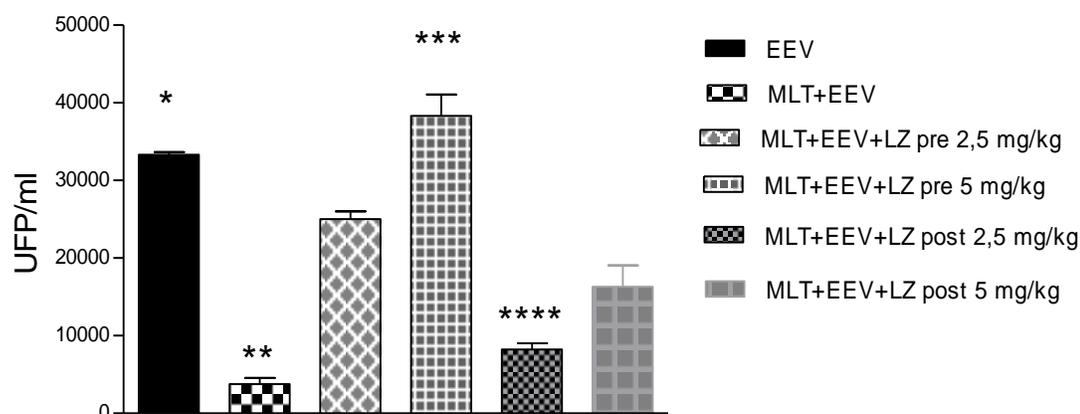


Figura 38.- Titulación Viral en suero de ratones infectados con el virus de EEV pretratados con MLT y pre/post-tratados con Luzindole (LZ) al 3^{er} día post-infección. * $p < 0,001$ con respecto a MLT+EEV y MLT+EEV+LZ post 2,5 y 5 mg/kg, ** $p < 0,01$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg y MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg, *** $p < 0,001$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg y MLT+EEV+LZ pre 2,5 mg/kg, **** $p < 0,001$ con respecto a MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg

Los títulos virales correspondientes al 5^{to} día post infección en sueros de animales infectados con EEV ($22,111 \times 10^3 \pm 2,589 \times 10^3$ UFP/ml) fueron mayores ($p < 0,05$) que los detectados en el resto de los grupos estudiados, con excepción del grupo MLT+EEV+LZ pretratados con LZ a concentraciones 5 mg/Kg. En los animales pretratados a concentraciones de 2.5mg/Kg. ($14,555 \times 10^3 \pm 3,405 \times 10^3$ UFP/ml) y 5 mg/Kg. ($18,333 \times 10^3 \pm 1,528 \times 10^3$ UFP/ml), y MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones de 5 mg/Kg. ($13,667 \times 10^3 \pm 3,215 \times 10^3$ UFP/ml), los títulos fueron mayores a los de los grupos de MLT+EEV ($3,666 \times 10^3 \pm 1,453 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post 2,5 mg/Kg. ($7,333 \times 10^3 \pm 6,67 \times 10^2$ UFP/ml) (Figura 39).

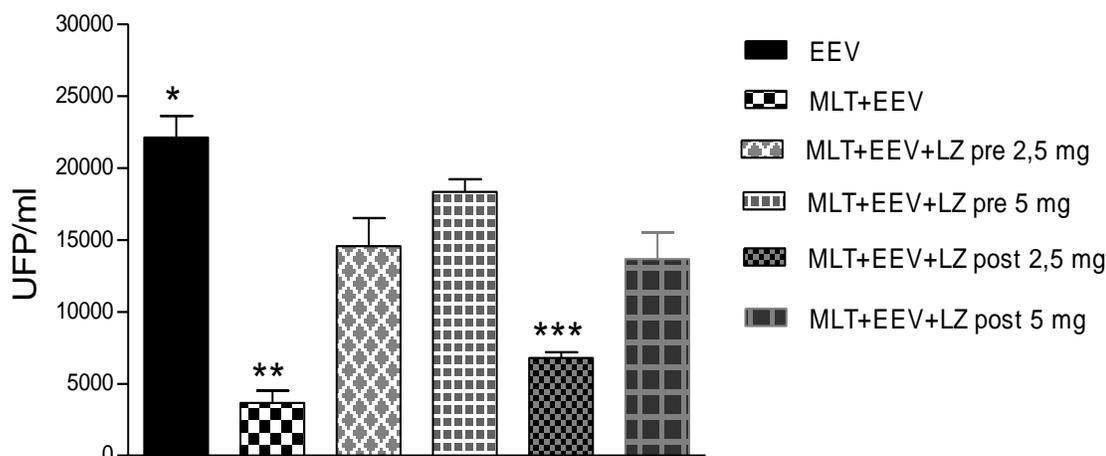


Figura 39.- Titulación Viral en suero de ratones infectados con el virus de EEV pretratados con MLT y pre/post-tratados con Luzindole (LZ) al 5^{to} día post-infección. * $p < 0,05$ con respecto al resto de los grupos excepto MLT+EEV+LZ pre 5 mg/kg, ** $p < 0,01$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg; MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg, *** $p < 0,01$ con respecto a MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg

En los homogeneizados cerebrales correspondientes al 1^{er} día post infección, los títulos virales detectados en los animales infectados con EEV ($83 \times 10^3 \pm 3 \times 10^3$ UFP/m), fueron mayores ($p < 0,05$) que los observados en los grupos de MLT+EEV ($2733 \times 10^3 \pm 5132$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones de 2,5 mg/Kg. ($30,667 \times 10^3 \pm 4,041 \times 10^3$ UFP/ml). En los grupos MLT+EEV+LZ pretratados con concentraciones de 2,5 mg/Kg. ($67,667 \times 10^3 \pm 6,807 \times 10^3$ UFP/ml) y 5 mg/Kg. ($84 \times 10^3 \pm 17,088 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados con concentraciones de 5 mg/Kg. ($68,333 \times 10^3 \pm 22,855 \times 10^3$ UFP/ml), se encontraron títulos mayores ($p < 0,05$), que en los grupos MLT+EEV y MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones de 2,5 mg/Kg. (Figura 40).

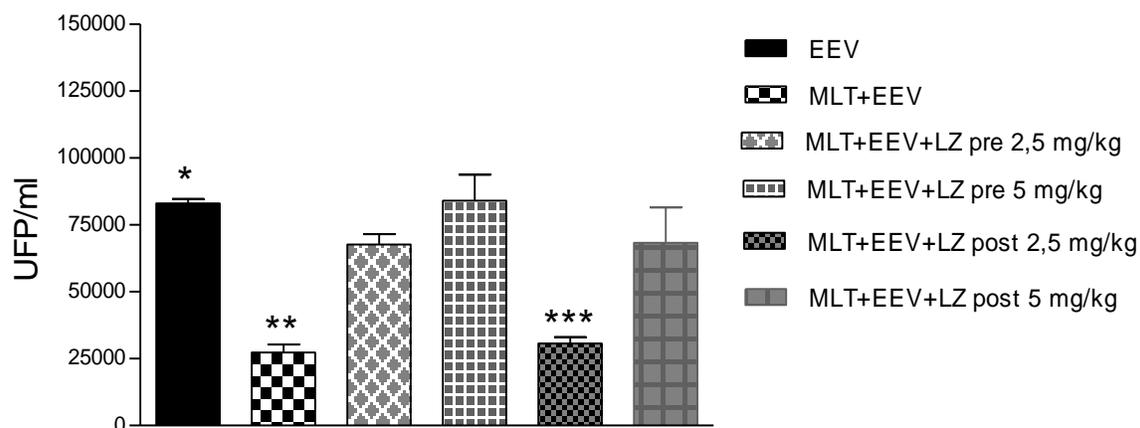


Figura 40.- Titulación Viral en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV pre-tratados con MLT y pre/post-tratados con Luzindole (LZ) al 1^{er} día post-infección. * $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV y MLT+EEV+LZ post 2,5 mg/kg, ** $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg y MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg, *** $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg y MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5/kg mg

En los resultados de la titulación viral al 3^{er} día post infección, en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV; se observó que títulos virales duplicaron los obtenidos al 1^{er} día post-infección. Se observaron títulos en los animales infectados con EEV ($152 \times 10^3 \pm 7,211 \times 10^3$ UFP/ml), mayores ($p < 0,05$) que los detectados en el grupo de MLT+EEV ($26,444 \times 10^3 \pm 6,678 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post 2,5 mg/Kg. ($41,111 \times 10^3 \pm 8,389 \times 10^3$ UFP/ml), pero menores a los observados en el grupo de MLT+EEV+LZ pretratados a 5 mg/Kg., que fue diferente del resto de los grupos estudiados. En los grupos de animales infectados y tratados con MLT (MLT+EEV) y MLT+EEV+LZ post-tratados a 2,5 mg/Kg. se obtuvo una titulación viral menor ($p < 0,05$) que la de los grupos de MLT+EEV+LZ (pretratados) a concentraciones de 2,5 mg/Kg. ($111,111 \times 10^3 \pm 49,141 \times 10^3$ UFP/ml) y 5 mg/Kg. ($235,555 \times 10^3 \pm 30,792 \times 10^3$ UFP/ml) y el grupo de MLT+EEV+LZ (post-tratados) a concentraciones de 5 mg/Kg. ($106,667 \times 10^3 \pm 11,930 \times 10^3$ UFP/ml) (Figura 41).

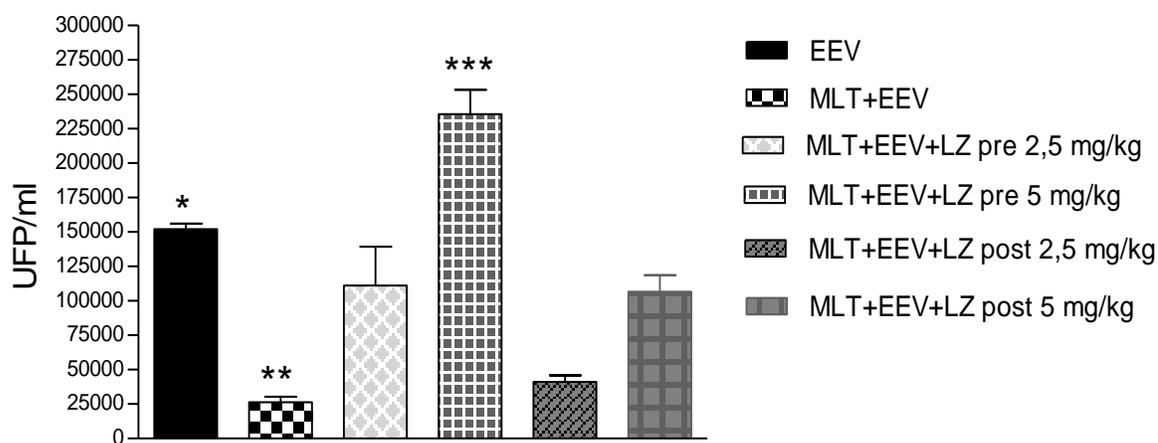


Figura 41.- Titulación Viral en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV pre-tratados con MLT y pre/post-tratados con Luzindole (LZ) al 3^{er} día post-infección. * $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV y MLT+EEV+LZ pre 5 mg/kg, ** $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg y MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg, *** $p < 0,05$ con respecto al resto de los grupos

En los homogeneizados cerebrales obtenidos al 5^{to} día post-infección, los títulos virales observados en los animales infectados ($173,333 \times 10^3 \pm 35,277 \times 10^3$ UFP/ml) fueron mayores ($p < 0,05$) que en el resto de los grupos estudiados, con excepción del grupo MLT+EEV+LZ (pretratados) a concentraciones de 5 mg/Kg., expresándose en los mismos un incremento en la viremia que se mantuvo hasta el 5^{to} día post-infección. En los grupos de animales infectados y tratados con MLT (MLT+EEV) ($22,222 \times 10^3 \pm 3,849 \times 10^3$ UFP/ml) y MLT+EEV+LZ post-tratados a 2,5 mg/Kg. ($35,333 \times 10^3 \pm 8,083 \times 10^3$ UFP/ml), los títulos virales fueron menores ($p < 0,01$) que en los grupos de MLT+EEV+LZ pretratados a concentraciones de 2.5 mg/Kg. ($102,111 \times 10^3 \pm 10,002 \times 10^3$ UFP/ml) y 5 mg/Kg. ($174,444 \times 10^3 \pm 18,954 \times 10^3$ UFP/ml), y

MLT+EEV+LZ post-tratados a concentraciones de 5 mg/Kg. ($91,667 \times 10^3 \pm 7,638 \times 10^3$ UFP/ml) (Figura 42).

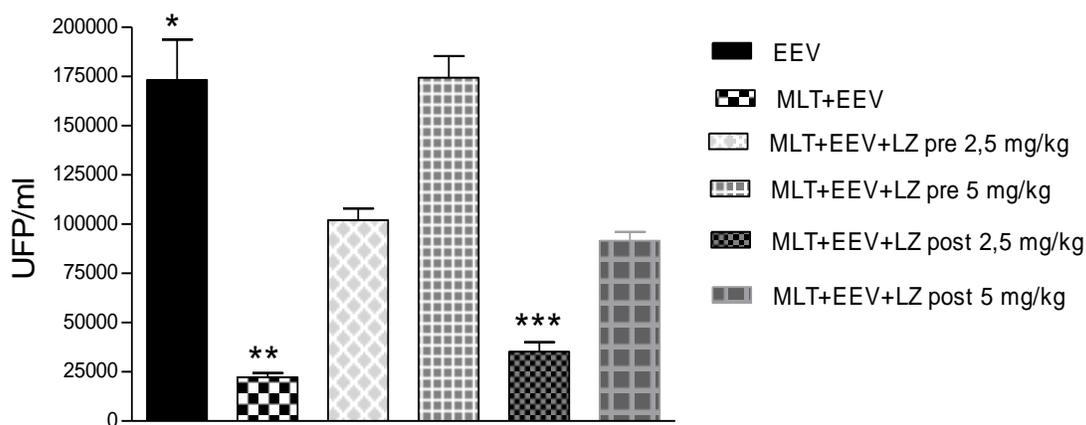


Figura 42.- Titulación Viral en homogeneizados cerebrales de ratones infectados con el virus de EEV pre-tratados con MLT y pre/post-tratados con Luzindole (LZ) al 5^{to} día post-infección. * $p < 0,001$ con respecto al resto de los grupos excepto MLT+EEV+LZ pre 5 mg/kg, ** $p < 0,01$ con respecto a MLT+EEV+LZ post 5 mg/kg y MLT+EEV+LZ pre 2,5 y 5 mg/kg *** $p < 0,05$ con respecto a MLT+EEV+LZ pre 2, 5 y 5 mg/kg.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se demuestra que la administración de MLT, ejerce un efecto protector en los ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana. Este hecho se hace evidente al evaluar, al sexto día pi, la tasa de mortalidad, la cual fue reducida del 100% al 16%, proporcionalmente al incremento de las dosis, de 0 a 1000 μ g /Kg de peso de MLT. La MLT postergó significativamente el comienzo de la enfermedad y prolongó la vida por varios días, en aquellos ratones infectados tratados con la hormona.

Maestroni y col., (1988), fueron los primeros en reportar que la MLT previene la parálisis y la muerte en ratones infectados con el virus de la encefalomiocarditis, después de un estrés agudo. Ben-Nathan y col., (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 μ g/Kg.) 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 los ratones inoculados con el virus de la EEV, encontramos que después de la inyección de una dosis similar de MLT, la mortalidad descendió de 100% a 40% (10 UFP) y a 47% (100 UFP), respectivamente.

Se sugiere un efecto directo de la MLT 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.

La MLT también prolongó el tiempo de sobrevida de ratones inmunodeprimidos e infectados con 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, la integridad del sistema inmunitario para ejercer su actividad protectora. La falta de efecto de la

MLT sobre los títulos virales en ratones inmunodeprimidos contrasta con el hallazgo de que la administración de MLT reduce las concentraciones virales en homogeneizados cerebrales de ratones inmunocompetentes (Bonilla et al., 1997), sugiriendo que el mecanismo antiviral estimulado por la MLT en ratones inmunocompetentes está disminuido o ausente en los animales inmunodeprimidos.

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 sobrevivencia de los ratones infectados inmunodeprimidos. A este respecto, se ha demostrado que en ratones con deleciones en los genes tanto del receptor para IFN $\alpha\beta$ (IFNAR-1^{-/-}) como del factor 2 regulador del IFN (IRF-2^{-/-}) fueron más susceptibles a la infección por EEV que los ratones controles. Los ratones IFNAR-1^{-/-} exhibieron diseminación acelerada del virus de EEV en el suero y cerebro cuando se compararon con los controles. En ratones IRF-2^{-/-}, el gen de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la inducción estuvo ausente después de la infección por EEV. Cuando se evaluaron las células involucradas en la producción de la iNOS se encontró que células microgliales cultivadas resultaron altamente sensibles a la infección por EEV. Además la infección incrementó los niveles de ON en esos cultivos, pero disminuyó en aquellos cultivos estimulados con IFN γ . Estos hallazgos sugieren que las especies reactivas de nitrógeno (RNS), juegan un papel importante en la extensión del virus de EEV (Schoneboom et al., 2000). Es interesante destacar que la MLT inhibe la actividad de la NOS cerebelar (Pozo, 1997) y es un potente reductor del ON *in vitro* (Noda, 1999). En cultivo de macrófagos murinos, la MLT inhibe la producción de ON debido a una reducción de los niveles del ARNm de iNOS y su expresión proteica (Gilad, 1998). En el presente trabajo se demostró que los esplenocitos de ratones infectados con el virus de EEV son capaces de generar grandes cantidades de ON, 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 ON 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 y col., (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 directamente sobre la replicación viral.

La propiedad inmunoestimuladora de la MLT está siendo cada día mayormente estudiada; de hecho, se han demostrado modificaciones en el ciclo de síntesis de la MLT, producidas por la administración de β -bloqueadores o por la iluminación permanente, manifestándose en el deterioro de la respuesta inmunitaria celular y humoral en roedores (Lesnikov y Korneva, 1992; Lissonni et al., 1993; Maestroni, 1995). Además, la administración exógena de esta hormona aumenta la producción de anticuerpos (Caroleo et al., 1992). La MLT fue capaz de aumentar la respuesta inmunitaria humoral ante antígenos T-dependientes, cuando fue inyectada crónicamente en ratones jóvenes o inmunodeprimidos por la edad y por el tratamiento con ciclofosfamida. Este efecto fue asociado con la inducción incrementada de la actividad de células T cooperadoras (T helper) y con la producción de IL-2. Sin embargo, en el presente trabajo no se detectó un incremento en la síntesis de IL-2 en los ratones tratados y no tratados con MLT, tres días después de la infección con el virus de la EEV. No obstante, no descartamos la posibilidad de un incremento de la producción de IL-2 durante la fase temprana de la infección viral e inmediatamente después de la administración de MLT, aún cuando el aumento significativo en los niveles séricos de $\text{IFN}\gamma$, ha sido asociado a una inhibición de la respuesta linfoproliferativa dependiente de IL-2 (Caroleo et al., 1992).

El efecto protector de la MLT en ratones infectados con el virus de la EEV, pudiera ser explicado por su propiedad inmunoestimuladora sobre la síntesis de $\text{IFN}\gamma$, IL-2, IL- 1β y TNF α . La producción temprana del $\text{IFN}\gamma$ por la MLT, observada en la presente investigación sugiere que el tratamiento previo con esta indolamina

incrementa la función antiviral del $\text{IFN}\gamma$, 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 el suero y cerebro de los ratones infectados tratados con MLT soporta esta suposición. 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 ($\text{TNF}\alpha$, anticuerpos neutralizantes, entre otros), que son considerados importantes para el control de infecciones producidas por virus citopáticos (Morrey et al., 1994; Ozmen et al., 1995).

En ratones, Grieder y col., (1997) reportaron que la cinética en la expresión de citocinas, después de la infección con el virus de la EEV clonado molecularmente, muestra que existe un patrón de expresión asociado con un rápido incremento de $\text{IFN}\gamma$, IL-6, IL-10, IL-12 y $\text{TNF}\alpha$, en ausencia de elevación de IL-2 e IL-4. Los resultados de nuestro trabajo corroboran y extienden estos hallazgos y muestran que la infección causada por el virus de la EEV activa la producción de $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-1 β , pero no de IL-2 e IL-4. Este hecho indica que es importante examinar si existen otras citocinas involucradas en una respuesta inmunitaria tipo Th1 o Th2 en la infección aguda por el virus de EEV o la implicación de las mismas en la “eliminación” viral.

La IL-1 β , el $\text{IFN}\gamma$ y el $\text{TNF}\alpha$ parecen ser mas sensibles a ser inducidos por la MLT que el resto de las citocinas ensayadas. Su elevación inmediata después del inicio del tratamiento con MLT y durante la infección viral, lo sugiere. De hecho, el tratamiento con MLT aumentó en el huésped la respuesta sérica de IL-1 β , sugiriendo un papel importante de la inmunidad en la resolución de la infección por EEV. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Morrey y col., (1994) quienes demostraron

que la MLT activa a los monocitos e induce sus propiedades citotóxicas, a través de la inducción de la síntesis de IL1. Sin embargo, aún cuando la MLT fue capaz de incrementar los niveles séricos de IFN γ y TNF α , el promedio de mortalidad obtenido en ensayos de bloqueo *in vivo*, sugieren que ni el IFN γ ni el TNF α son esenciales para ejercer el efecto protector en ratones, que hemos observado en la infección por EEV. Los niveles incrementados pudieran contribuir, pero el papel protector no parece ser mediado a través de éstas citocinas. Por el contrario, estos datos sugieren que la IL-1 β inducida por la MLT, es una citocina clave en la promoción de un estado inmunitario óptimo para la eliminación viral y/o ayuda a generar una respuesta inmunitaria mas eficiente y temprana contra la infección por el virus de EEV, ya que el 100% de los ratones murieron cuando la IL-1 β fue neutralizada.

Tomando en cuenta todos estos hallazgos, la MLT parece tener un efecto basado en la estimulación del sistema inmunitario, tal como hemos propuesto, posiblemente, mediado a través de la IL-1 β . Resultados preliminares en ratones infectados con EEV tratados con MLT, sugieren que el tratamiento con esta hormona estimula infiltrados celulares (predominantemente células microgliales) que posiblemente aumentan la extensión local de IL-1 β en el SNC, antes de la infección del virus de EEV. Otra evidencia a favor de este mecanismo, la constituye el hecho de que la MLT fue capaz de incrementar niveles cerebrales de IL-1 β y disminuir los de TNF α , en homogeneizados de cerebros perfundidos de ratones infectados con EEV tratados con MLT. En algunas infecciones virales del SNC se han reportado elevación de la IL-1 β en cerebro, tales como las producidas por los virus de Inmunodeficiencia humana (VIH) (Griffin et al., 1997) y en simios (Lane et al., 1997), el virus del Bosque de Semliki (Mokhtarian et al., 1996), virus de la rabia (Marquete et al., 1996) y virus Sinbis (Wesseling et al., 1994). Sin embargo, estos estudios no examinan directamente si la IL-1 β juega un papel protector o deletéreo en la infección viral del SNC. Liang y col., (1999) sugirieron que la deficiencia de IL-1 β protege contra la infección fatal por virus Sinbis. En contraste, en ratones deficientes de IL-1 β se ha observado una incrementada susceptibilidad al virus de Influenza (Kozak, 1995), y en

modelos animales con Poxvirus la inducción de esta citocina ha sido beneficiosa para el hospedador.

El TNF α , por el contrario parece ser sobre regulado en un amplio rango de desórdenes del SNC (Probert et al., 1995), y ha sido implicado tanto en la muerte como en la supervivencia celular neuronal (Beattie et al., 2000; 2002; Allan et al., 2001; Yang et al., 2004). En la infección por el virus de la EEV se presume que la sobre estimulación en astrocitos por niveles incrementados de TNF α , aumenta la producción de factores estimuladores de colonias (CSF) que pudieran promover la migración de granulocitos y macrófagos a sitios de inflamación dentro del SNC (Tweardy et al., 1999); sin embargo, es razonable asumir que la disminución significativa del TNF α inducida por la MLT en ratones infectados con EEV conduce a una disminución de la respuesta inflamatoria en el SNC y a mejorar la alteración en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, que ocurre durante la infección en el SNC, lo que podría proteger el cerebro en los animales infectados.

En humanos, se ha propuesto que la MLT representa un regulador neuroendocrino de la producción de IL-4 por las células T cooperadoras de la médula ósea. Este mecanismo neuroendocrino-citocina pudiera explicar el rescate hemopoiético producido por la MLT, así como las propiedades antitumoral e inmunoestimuladora que posee la MLT (Maestroni et al., 1999). Sin embargo, nuestros resultados muestran que aunque los niveles de IL-4 fueron incrementados por la MLT, no se detectaron cambios en los animales infectados tratados con la hormona. El efecto estimulador de la MLT sobre la cinética de liberación de la IL-2 e IFN γ y la falta de influencia sobre la IL-4 sugiere el predominio de una respuesta celular tipo Th1, tal como Maestroni y col., (1990), han propuesto.

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. Este hallazgo coincidió con un

incremento sérico de IL-10 en ratones tratados con diferentes dosis de 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 ON en el tejido cerebral y el suero de animales infectados con el virus de la EEV, que fue disminuido por el tratamiento con MLT. 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 la MLT puede contrarrestar este efecto. El aumento del ON 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 ON y de la lipoperoxidación sugiere que el ON estaría actuando como elemento oxidante durante la infección por el virus de la EEV. A este respecto, se ha reportado la capacidad del ON para inducir lipoperoxidación (Horton, 2003); además, la inducción de estrés oxidativo cerebral por el virus de la EEV, ha sido previamente reportado por Schoneboom y col., (2000) quienes determinaron que el virus de la EEV es capaz de inducir la expresión de genes de la iNOS y del ON como un mecanismo de degeneración de neuronas y astroglia (Schoneboom et al., 2000). 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 ON por el virus de la EEV, parece ser un mecanismo de patogénesis usado por otros virus. Valero y col., (2002) encontraron aumento en la producción de ON 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 ON como estrategia de defensa ante las infecciones causadas por los virus de Encefalitis Japonesa e Influenza (Lin et al.,

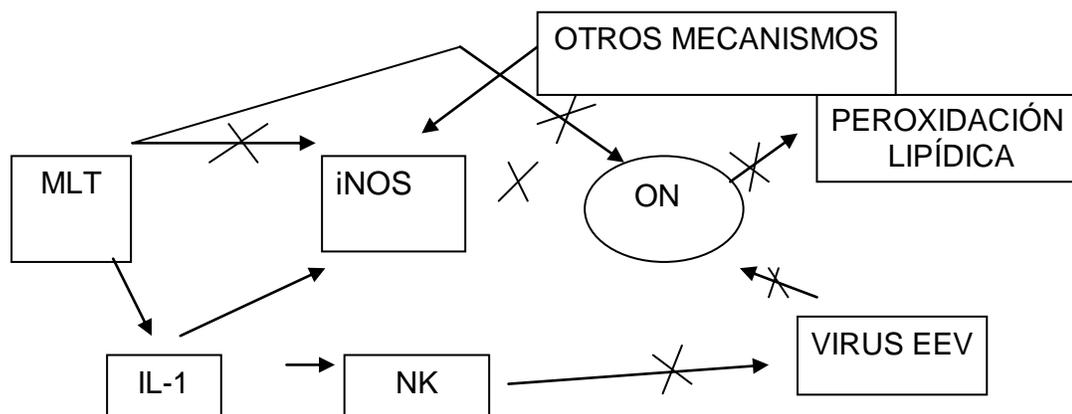
1997; Rimmelzwaan et al., 1999); Sin embargo el papel del ON en cuanto a su efecto sobre el ciclo viral parece controversial, dado que la producción de ON puede ser activada de forma específica por algunos virus como el de la EEV, relacionándose las elevadas concentraciones de ON con la severidad de la infección (Ondine et al., 2001; 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; Claustrack et al., 2005). Previos estudios han demostrado el efecto beneficioso de esta hormona en el modelo murino de la infección por el virus de la EEV. (Bonilla et al., 1997; Valero, 1998; Medina-Leendertz et al., 1999; Bonilla et al., 2001; Medina-Leendertz et al., 2001; Negrette et al., 2001; Valero et al., 2002; Arias et al., 2003; Bonilla et al., 2003; Bonilla et al., 2004). La disminución de la producción de ON 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 ON (Bonilla et al., 2004; Chang et al., 2005; Killic et al., 2005). Similares resultados, se han reportado en un modelo de abrasión del cuello uterino en ratones, donde el tratamiento con MLT disminuyó los niveles tisulares de ON acompañados con disminución de la peroxidación lipídica (Ara 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).

Posiblemente el mecanismo regulador de la producción del ON durante la infección del SNC por el virus de la EEV sea más complicado. Estudios previos han demostrado que la MLT induce aumento de la IL-1 β en el cerebro y el suero de ratones infectados por el virus de la EEV, sugiriéndose que el efecto protector de esta hormona pudiese estar relacionado con el aumento de esta citocina (Valero et al., 2002; Bonilla et al., 2003). A este respecto se ha demostrado la capacidad de la IL-1 β

de inducir la expresión de la iNOS, tanto en células de origen neurológico (Valles et al., 2004; Jana et al., 2005) como de otros tipos (Yang et al., 2004; Guikema et al., 2005; Ling et al., 2005; Maddona et al., 2005). Esta acción de la MLT pudiese estar en contraposición con su efecto bloqueador de la iNOS, estableciéndose la necesidad de estudiar en el contexto de la infección cerebral por el virus de la EEV, si existen mecanismos que modulen la acción de la IL-1 β sobre la expresión de la NOS o si se establece una vía de inducción de la IL-1 β por la MLT, relacionada a su vez a la expresión de esta enzima con ulterior bloqueo por la MLT y consecuente disminución de la producción de ON. Es interesante resaltar que durante la infección experimental por el virus de EEV, la IL-1 β es capaz de inducir actividad antiviral a través de la activación y potenciación de las células asesinas naturales (NK) (Huprikar et al., 1990), hallazgos que pudieran sustentar en parte lo encontrado en el presente estudio en el cual se demuestra una elevada producción sérica y en homogenados cerebrales de IL-1 β en ratones infectados que recibieron tratamiento con MLT.

Basados en reportes previos y los resultados observados se pretende hipotetizar un posible mecanismo de acción de la MLT relacionado a la inducción de IL-1 β y a la producción de ON durante la infección por el virus de EEV en el cerebro del ratón:



Induce (→); Disminuye o bloquea (—X→).

La MLT puede bloquear la expresión de la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS) y atrapar el ON libre disminuyendo la producción de los productos de la peroxidación lipídica. A su vez la MLT puede inducir la producción de interleucina-1 β que a su vez puede inducir la expresión de iNOS. Otros mecanismos durante la infección viral pudieran inducir la expresión de la iNOS, pero como resultado final la MLT puede bloquear la expresión de estos genes y disminuir la producción del ON. Teniendo en cuenta que la MLT puede estimular la producción de IL-1 β y ésta puede inducir la producción de células NK contra el virus de la EEV, la eliminación del virus puede disminuir la inducción de la expresión de la iNOS.

Cabe destacar que el efecto de la MLT sobre la peroxidación lipídica puede ser más amplio que el bloqueo del sistema del ON. La MLT tiene un poder antioxidante ampliamente demostrado (Reiter, 2000; Denle et al., 2005; Kerman et al., 2005; Tomás-Zapico y Coto-Montes, 2005) y además puede actuar sobre la producción o el bloqueo de otras especies de oxígeno reactivo a través de su efecto sobre la superóxido dismutasa, la catalasa y el glutatión reducido, modificándolos para disminuir el estrés oxidativo y la lipoperoxidación (León et al., 2004; Akcay et al., 2005; Ara et al., 2005).

Los hallazgos en el suero pueden representar un reflejo de la infección en el SNC. Se encontró aumento en el contenido de ON sérico en el tercer y cuarto día post infección, que disminuyó con la administración de la MLT; sin embargo, no se apreciaron cambios en el contenido de Sustancias Reactivas al ácido Tiobarbitúrico (SRT) como indicador indirecto del MDA. Esto sugiere que siendo el ON una sustancia más difundible, pudo pasar a la circulación en los animales infectados y decreció su concentración cuando disminuyó su producción en el cerebro por efecto de la MLT. 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.

Por otro lado, el efecto antioxidante de la MLT en la producción de ON durante la infección por el virus de la EEV, fue observado *in vitro* en cultivos de neuroblastoma múrido. En los estudios realizados en los sobrenadantes de estos cultivos, se apreció aumento de ON en los cultivos infectados y disminución de su concentración cuando las células fueron tratadas con MLT a diferentes dosis y tiempos de ensayo. La consecuente peroxidación lipídica, observada en los cultivos infectados, también fue disminuida por la MLT; no obstante, este efecto no fue dosis dependiente, pero si relacionado al tiempo de tratamiento.

Estos hallazgos fueron muy similares a los encontrados *in vivo* 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 ON (Schoneboom et al., 2000).

Se encontró un incremento en el contenido celular de nitritos a las 6 horas de cultivo en las células infectadas por el virus, que no fue afectado por el tratamiento con MLT. Esta cantidad decreció durante el resto del experimento. Sin embargo el contenido celular de SRT se mantuvo elevado en todos los tiempos estudiados, no apreciándose efecto significativo de la MLT. Estos datos sugieren que la MLT disminuyó la producción de ON y su salida al medio extracelular y que la presencia aumentada de SRT intracelular puede ser debido a la acumulación residual de estas sustancias después del bloqueo por la MLT, en vista de que los valores observados intracelularmente son muy similares a los valores extracelulares encontrados después del tratamiento con la MLT y que en ambas condiciones la cantidad celular residual disminuía por acción del virus de la EEV que es altamente citopático.

En los animales no infectados tratados con MLT se encontró un efecto ligeramente inverso sobre los niveles de ON en los primeros estadios de la infección,

los cuales fueron disminuidos en suero y aumentados en el tejido cerebral. Este efecto dual de la MLT ha sido previamente reportado porque puede ser un fuerte anti-oxidante y también un pro-oxidante (Skrzydłewska, 2001; Wolfler, 2001; Allegra et al., 2003). Sin embargo, los niveles de SRT fueron también encontrados disminuidos con el tratamiento con MLT bajo condiciones de no infección, a pesar que en el tejido cerebral indujo aumento en la producción de ON; 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., 2003; Bonilla et al., 2004; Chang et al., 2005; Killic et al., 2005) y por ende la MLT puede tener efectos moduladores diferentes.

Otros resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que la administración de LZ ejerce un efecto inhibitor de la actividad reguladora y protectora de la MLT, en ratones infectados con el virus de EEV. Este hecho se hace evidente al evaluar, en los días 6, 7 y 8 p.i, a los animales que recibieron tratamiento con MLT al compararlos con los pre y post-tratados con LZ. La tasa de mortalidad se incrementó en un 100%, en ratones infectados y tratados con LZ, mientras que la MLT postergó significativamente el comienzo de la enfermedad y prolongó la vida por varios días.

En cuanto al efecto antagonista del LZ, en los ratones inoculados con el virus de EEV se encontró que después de la inyección de una dosis de 500 µg/Kg. de MLT, la mortalidad descendió de 100% a 45% a diferencia de lo observado en los ratones infectados y los tratados con LZ en los cuales se obtuvo un 100% de mortalidad, hallazgo que sugiere que el efecto antiviral y/o inmunomodulador de la MLT es mediado a través de la interacción con los receptores celulares de membrana, debido probablemente a que el LZ logró desplazar competitivamente a la MLT, y de esta manera invertir el efecto protector de la MLT ante la infección con el virus de EEV.

Según Valero (1999), la MLT ejerce un efecto basado en la estimulación del sistema inmunitario, generando una influencia positiva sobre la resistencia del hospedador, a través de un efecto inmunoestimulador, más que sobre la replicación

viral. Por otro lado, Rabinowitz y Adeler (1973), han sugerido que el fenómeno encefalítico en el modelo múrido, es debido a un incremento en la respuesta inmunitaria local en el SNC, más que a la replicación del virus dentro del mismo.

No obstante, en el presente estudio se observó una elevación en los títulos virales en los sueros y homogeneizados cerebrales de los animales infectados con el virus de EEV y en los infectados tratados con MLT y LZ. Dichos títulos fueron incrementando sus niveles a medida que transcurrían los días post-infección al compararlos con los animales tratados con MLT; acontecimientos que evidencian que la MLT es capaz de disminuir significativamente la viremia y los títulos virales en el cerebro de ratones infectados, efecto que el LZ revertió al observarse, en los grupos que recibieron este antagonista, una elevación de los mismos, detectándose incluso títulos mayores que los detectados en el grupo infectado que no recibió tratamiento con MLT ni LZ.

El efecto protector de la MLT en ratones infectados con el virus de EEV, podría ser explicado por su propiedad inmunoestimuladora sobre la síntesis de IL-1 β , IFN γ y TNF α , como una respuesta inmunitaria temprana ante el virus de EEV durante la infección primaria (Valero et al., 2006). La IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria que actúa como mediador en una gran cantidad de patologías del SNC. Participa en la defensa primaria contra la infección por el virus de EEV (Fassbender et al., 2000; Montero E., 2006).

A pesar de que en el presente estudio se observó que tanto el efecto de la MLT exógena como la endógena, fue bloqueado por el antagonista LZ; existen muchas controversias en cuanto a la selectividad del mismo para con los diferentes subtipos de receptores de membranas y nucleares de MLT (MT1, MT2, MT3). Algunos autores sugieren que el LZ es un antagonista de los receptores MT2 (Hogan et al., 2001; Gerdin et al., 2003). Otros afirman que es un antagonista no selectivo (Masana et al., 2002; Falcon et al., 2003; Anhé et al., 2004; Hunt et al., 2001; Dubocobich et al., 1997,1998); sin embargo, los estudios realizados por Dubocobich y Markowska (2005),

parecen confirmar que el LZ, es un antagonista competitivo y efectivo para los tres diferentes subtipos de receptores de MLT, hecho que pudiera explicar el bloqueo total del efecto de la MLT observado en el presente estudio.

Tomando en cuenta todos los hallazgos de esta investigación se demuestra que el efecto protector de la MLT durante la infección con el virus de la EEV, tanto *in vivo* como *in vitro*, pudiese ser debido a mecanismos antioxidantes e inmunorreguladores mediado por la producción de ON, la peroxidación lipídica y la IL-1 β en el SNC. Se requieren nuevos estudios para definir los mecanismos íntimos que permiten a la MLT modular la producción del ON 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 etarios. Los pacientes usualmente presentaron dolor de cabeza severo, mialgia, postración, vómito y en algunos casos diarrea (Valero et al., 1996). Las convulsiones, desorientación y la depresión mental fueron hallazgos frecuentemente observados en los pacientes. Se reportaron más de 20 muertes asociadas al virus, entre adultos y niños de Venezuela y Colombia. Por esta razón, el efecto protector de la MLT en ratones infectados con el virus de la EEV, garantiza futuras investigaciones, especialmente en lo referente a las vías de administración de la MLT, a fin de reducir la tasa de mortalidad de los ratones infectados y la posibilidad de utilizar esta hormona para el tratamiento de humanos y équidos infectados con o susceptibles a la infección con este virus.

VI. CONCLUSIONES

De este trabajo experimental de análisis *in vivo* e *in vitro* del efecto Inmunomodulador de la melatonina en modelos experimentales de infección por el EEV, se deducen las siguientes conclusiones:

1. El tratamiento preventivo y mantenido con MLT ejerce un efecto protector en ratones infectados por el virus de EEV, aumentando la supervivencia.
2. El tratamiento con MLT induce un efecto inmunomodulador sobre los animales infectados con EEV que se caracteriza por un incremento de los niveles citocinas proinflamatorias y de patrón Th1, predominando la elevación de la IL-1 β . El impacto terapéutico de este aumento de la IL-1 β se considera muy relevante ya que la deprivación funcional de esta citocina se asocia a una dramática mortalidad.
3. La MLT induce un efecto antioxidante en los animales infectados con EEV
4. La administración de LZ bloquea el efecto terapéutico de la MLT, por lo que el mecanismo de acción de la administración exógena de esta neurohormona se ejerce a través de su interacción con sus receptores específicos
5. MLT inhibe el efecto citopático del virus EEV en cultivo celulares sin poseer una acción directa sobre su replicación
6. Tomados en conjunto estos resultados se concluye que MLT posee un efecto terapéutico sobre la infección por el virus de la EEV, cuya relevancia clínica deberá establecerse en futuros trabajos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Allan SM., Rothwell NJ. Cytokine and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci.** 2: 734-744, 2001.
3. Angeli A., Gatti G., Sartori ML., Del Ponte D., Cerignola R. Effect of exogenous Melatonin on human natural killer (NK) cell activity. An approach to the immunomodulatory role of the pineal gland. **The Pineal Gland and Cancer, Muller and Bass, Tubingen.** 145-157, 1988.
4. 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.
5. Atre D., Blumenthal EJ., Melatonin: immune Modulation of spleen cell in young, middle-aged and senescent mice. **Mech Ageing Dev.** 103 (3): 255-268, 1998.
6. Avilan R. Situación actual de la Encefalitis equina Venezolana y otras arbovirosis en Venezuela. **Gaceta Médica de Caracas.** 104 (1): 14-24, 1996.
7. Beattie MS., Farooqui A., Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. **J Neurotrauma.** 17: 915-925, 2000.
8. Beattie EC., Siellwagen D., Morisbha W. Control of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. **J Neurosci.** 22: 3025-3032, 2002.
9. 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.
10. Bellard M., Levin S., Bonilla E. Encefalitis equina Venezolana. Revisión. **Inves Clin** 30 (1): 31-58, 1989.
11. Ben- Nathan D., Maestroni G J., Lusting S., Conti A. Protective effects of Melatonin in mice infected with encephalitis viruses. **Arch Virol.** 140: 223-230, 1995.
12. Ben- Nathan D., Maestroni G.J., Lustig 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.
13. Benenson A. Manual para el control de las Enfermedades Transmisibles. **Publicación Científica** N° 564 O.P.S 16ta Edición 144-145, 501-512, 1997.

14. Bennett J., Plum F., Cecil D. **Tratado de Medicina Interna**. McGraw Hill Interamericana s.a de c.v, 20° Edición, 2005-2092, 1996.
15. Bonilla, E., Rodón C., Valero, N., Pons, H., Chacín-Bonilla, L., García, J., Rodríguez, Z., Medina-Leendertz, S., Añez, F. Melatonin prolongs survival of immunodepressed mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 95: 207-210, 2001.
16. Bonilla E., Valero N., Chacin-Bonilla L., Medina-Leendertz S. Melatonin and viral infections. **J Pineal Res.** 36(2): 73-9. 2004.
17. 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.
18. Bonilla E., Valero-Fuenmayor N., Pons H., Bonilla-Chacin, L. Melatonin protects mice infected with Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus. **Cell Mol Life Sci.** 53: 430-434, 1997.
19. Bergold G.H., Mazzali R. Plaque formation by arbovirus. **J Gen Virol.** 2:273-284, 1968.
20. 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.
21. Calisher C., Shope R., Brandy W., Wrebe M. Propose antigenic classification of registered Arboviruses, Togaviridae, Alfavirus. **Intervirolgy** 14: 229-323, 1980.
22. Caroleo M.C., Frasca D., Nistico G., Doria G. Melatonin as immunomodulator in immunodeficient Mice. **Immunopharmacol.** 23: 81-89, 1992.
23. Castro A., Jimenez W., Claria J., Ros J., Martinez JM., Bosch M., Arroyo V., Plulats J., Rivera F., Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. **Hepatology**; 18:367-72,1993.
24. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Informe Epidemiológico sobre Encefalitis equina. Río de Janeiro. **Panaftosa.** 8-15, 1994.
25. Colombo L., Chen G.J., López M.C., Watson R. Melatonin induced increase in gamma- interferon production by murine splenocytes. **Immunol Letters.** 33: 123-126, 1992.
26. Cuesta A., Cerezuela R., Esteban MA., Meseguer J. In vivo actions melatonin on the innate immune parameters in the teleost fish gilthead seabream. **J Pinneal Res.** 17:1888-1895, 2008
27. De La Hoz F. Encefalitis equina Venezolana. **MVZ-Cordoba** 5(1): 18-22, 2000.

28. Dickerman R., Scherer W., Diaz-Najera A. Ecologic studies of Venezuela encephalitis virus in southeastern México. I. Induction and study sites, **Am J Trop Med Hyg**, 20: 730-739, 1971.
29. Di Mascio P., Denes P., Garcia C. Ghost Protein damage by peroxy-nitrite and its protection by Melatonin. **Braz J Med Biol Res**. 33(1): 11-17, 2000.
30. Dubocovich ML. Melatonin receptors: are there multiple subtypes?. **Trends in Pharmacological Sciences**. 16(2): 50-56, 1995.
31. Dubocovich, ML., Luzindole (N-0774): A Novel Melatonin Receptor Antagonist. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 902-910, 1988.
32. Dubocovich, ML., Masana M., Iacob S., Sauri D., Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human MEL_{1a} and MEL_{1b} recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. **Archives of Pharmacology**. 355: 365-375, 1997.
33. 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, 1998.
34. Dubocovich M.L., Markowska, M. Functional MT₁ and MT₂ Melatonin receptors in mammals. (Review) **Endocrine** 27:101-103, 2005.
35. 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: 705-716, 1988.
36. Finnochiario L., Nahmod V., Launay JM. Melatonin biosynthesis and metabolism in peripheral blood mononuclear leucocytes. **Biochem J**. 280: 727-731, 1991.
37. Frank P., Johnson K. An outbreak of Venezuelan Equine Encephalomyelitis in Central American, evidence for exogenous source of a virulent virus subtype. **Am J Epidemiol** (3): 94-487, 1997.
38. Giannoulia-Karantana A., Vlachou., polychronopoulou S., Papassotiriou I., Chrousos GP. Melatonin and immunomodulation: connections and potential clinical applications. **Neuroimmunomodulation**, 13(3): 133-144, 2006.
39. 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 NFκB activation. **FASEB J**. 12: 685-693.1998.
40. Grieder F., Davis H., Zhou XI. Kinetics of cytokine expression and regulation of host protection following infection with molecularly

- cloned Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Virology*. 233:302-312, 1997.
41. Griffin D. Cytokines in the brain during viral infection: clues to HIV-associated dementia. *J Clin Invest*. 100:2948-2951, 1997.
42. González-Haba M. García-Mauriño S., Calvo R., Goberna JR., Guerrero JM., High-affinity binding of Melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). *Faseb J*. 9. 1331-1335, 1995.
43. Guerrero JM., Calvo JR., Oscuna C., López-González MA. Binding of Melatonin by lymphoid cell in humans and rodents. *Adv Pineal Res*. 7: 109-117, 1994.
44. Hammom W., Sather G., Arboviruses. *In diagnostic procedures for viral and rickettsial infection*, Lennette, A. & Smichdt, N. J. (editors). New York: American Public Health Association. 227-280, 1969.
45. Hudson L., Hay F. *Practical Immunology*. In Blackwell Scientific eds; St. Louis, mo xvi, 359, 1980.
46. Humbert W., Pevet P. The decrease of pineal Melatonin production with Age. *Ann NY Acad Sci*. 43-63, 1993.
47. Johson K., Martin D. Venezuelan Equine Encephalitis. *Adv Vet Sci Comp Med*. (18): 17-79, 1974.
48. Kosak W. Thermal and behavioural effects of lipopolysaccharide and influenza in interleukin- 1 beta deficient mice. *Am J Physiol*. 269: 969-977, 1995.
49. Lahiri D., Ghosh C. Interactions between Melatonin, reactive oxygen species, and nitric oxide. *Annals of the New York Academy of Science* 893: 325-330, 1999.
50. Lane T., Bucmener MJ., Watry D. Expression of inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in brains of SIV-infected rhesus monkeys: applications to HIV-induced central nervous system disease. *Mol Med* 1: 27-37, 1996.
51. Larreal F., Godoy O., Montiel L., Sanchez N. Encefalitis Equina Venezolana, crónica de una epidemia, Venezuela M.S.A.S. *Dir Vig Epid*. 1-5, 1996.
52. Lee S., Chilton E., Pak JM. Adenosine receptor blockade reduces splanchnic hyperemia in cirrhotic rats. *Hepatology*. 15:1107-11, 1992.
53. Lesnikov V., Korneva A. The involvement of pineal gland and Melatonin in immunity and aging: II Thyrotropin-releasing hormone and Melatonin forestall involution and promote reconstitution of the thymus in anterior hypothalamic area (AHA)- lesioned mice. *Inter J Neurosci*. 62: 141-153, 1992.
54. Liang XH., Goldman JE., Jian H. Resistance of interleukin- 1 β -deficient mice to fatal Sindbis virus encephalitis. *J Virol*. 73: 152: 2563-2567, 1999.

55. Linthicum G., Gordon S. Comparative infections of epizootic and enzootic of Venezuelan equine encephalomyelitis virus in *Amblyoma cajenense*. **J Med. Entomol** (295): 827-831, 1992.
56. Lissoni P., Brivio F., Bani S. Low dose subcutaneous interleukin 2 therapy in association with the pineal indole Melatonin in treating AIDS. Abstract. **Recent Advances in Chemotherapy, 18th International Congress of Chemotherapy**. 769-770, 1993.
57. Lopez-Gonzalez MA., Calvo JR., Oscura C., Guerrero JM. Interaction of Melatonin with human lymphocytes : Evidence for binding sites coupled to potentiation of cyclic AMP stimulated vasoactive intestinal peptide and activation of cyclic GMP. **J Pineal Res**. 12: 97-104, 1992.
58. Ludwinski R., Newhouse V. Epidemic Venezuelan Equine Encephalitis in North America: Summary of virus-vector host relation. **Am J Epidemiol**. 101 (1): 3-15, 1975.
59. Maestroni GJ. Therapeutic potential of Melatonin in immunodeficiency states, viral diseases and cancer. **Adv Exp Med Biol**. 467: 217-226, 1999.
60. 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.
61. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity III. Melatonin antagonizes the immunosuppressive effect of acute stress via an opiate mechanism. **Immunology**. 63(3): 465-469, 1988.
62. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity. Circadian synthesis and release of Melatonin modulates the antibody response and antagonize the immunosuppressive effect of corticosterone. **J Neuroimmunol** 13: 19-30, 1986.
63. Maestroni GJ. T- helper 2 lymphocytes as peripheral target of Melatonin signaling. **J Pineal Res**. 18: 84-89, 1995.
64. Maestroni GJ., Conti A., Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiate mechanism. **Clin Exp Immunol** 68, 384-391, 1988.
65. Maestroni GJ., Convacci V., Conti A. Hematopoietic rescue via T-cell dependent, endogenous Granulocyte-Macrophage colony Stimulating Factor induced by the pineal neurohormone Melatonin in tumor bearing mice. **Cancer Res** 54: 2429-2432, 1994.
66. Martz E., Howell D. Virus control cells first and cytolytic cell second. **Immunol Today**. 10:79-86, 1989.
67. Mathews J., Roehrig J., Specificity of the murine T- helper cell immune response to various alphavirus. **J Gen Virol**. 70: 2877-2886, 1989.

68. Marquette C., Van Dam Am., Ceccaldi PE. Induction of immunoreactive interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha in the brains of rabies virus infected rats. **J Neuroimmunol.** 68: 45-51, 1996.
69. McIntyre K., Stepan K., Kolinsky W., Benjamin W., Killian P. Inhibition of IL-1 binding and bioactivity *in vitro* and modulation of acute inflammation *in vivo* by IL-1 receptor antagonist an anti-IL-1 receptor monoclonal antibodies. **J Exp Med** 173: 931-939, 1991.
70. Medina M., 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.
71. Medina M., 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.
72. Mokhtarian F., Wesseling Sl., Choi S. Production and role of cytokines in the CNS of mice with acute viral encephalomyelitis. **J Neuroimmunol.** 66: 11-22, 1996.
73. Molero-Leal, M. Aspectos fisiológicos y fisiopatológicos del óxido nítrico en los tejidos de los mamíferos. **Invest Clin.** 39(2): 125-154, 1998.
74. Morse S.; Schluederberg T. Emerging viruses the evolution of viruses and viral diseases. **J Infect Dis.** (162): 1-7, 1990.
75. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med.** 329:2002-12, 1993.
76. Morrey K., Mclachlan A., Serkin C., Bakouche O. Activation of human monocytes by the pineal hormone Melatonin. **J Immunol.** 153: 2671-2680, 1994.
77. 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.
78. Neri B., De Leonardis V., Gemelli M. T., Di Loro F., Mottola A., Ponchiotti R., Raugeri A., Cini G. Melatonin as biological response modifier in cancer patient. **Anticancer Res.** 27. 159-163, 1998.
79. Noda Y., Mori A., Liburdy R., Packer L. Melatonin and its precursors scavenge nitric oxide. **J Pineal Res.** 27: 159-163, 1999.
80. Orange J., Salazar T., Opal S., Spencer S., Miller A. Mechanism of interleukin 12 mediated toxicities during experimental viral infections: Role of tumor necrosis factor and glucocorticosteroids. **J Exp Med** 181:901-914, 1995.

81. Organización Panamericana De La Salud. Sistema de información y vigilancia epidemiológica de la Encefalitis Equina Venezolana en la región de las Américas. **Rev Panam Salud Pública.** 6 (2): 128-138, 1999.
82. Ozmen L., Aguet T., Trinchieri G., Garotta G. The in vivo antiviral activity of interleukin-12 is mediated by gamma interferon. **J Virol.** 69: 8147-8150, 1995.
83. 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.
84. Pedersen C., Eddy F., Separation, isolation and immunological studies of the structural proteins of Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus. **J Virol,** 14(4):740-744, 1974.
85. Pioli C., Carleo C., Nistico G., Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and nonspecific signal for t-cell proliferation. **Int J Immunopharmacol.** 15: 463-468, 1993.
86. Pioli C., Carleo C., Nistico G., Doria G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and nonspecific signal for t-cell proliferation. **Int J Immunopharmacol.** 15: 463-468, 1993.
87. Pozo D., Reiter Rj., Calvo Jr. Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by Melatonin via complex calmodulin. **J Cell Biochem.** 65: 430-442, 1997.
88. Proberi L., Akassoglou K., Pasparakis M. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system specific expression of tumor necrosis factor α . **Proc Natl Acad Sci USA.** 92: 11294-11298, 1995.
89. Rabinowitz S., Adeler W. Host defense during primary Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus infection in mice. **J Immunol.** 110 (5): 1345-1353, 1973.
90. Reed L., Muench M. A simple method of stimulating fifty percent end points. **Amer J Trop Med Hyg.** 27: 493-497, 1938.
91. Reiter R. Functional pleiotropy of the neurohormone Melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. Abstract. **Front Neuroendocrinol.** 6 (4): 383-415, 1995.
92. Reiter R. Melatonin: Lowering the High price of free radicals. **New in physiological Science.** 15(5): 246-250, 2000.
93. Reiter R.J. Melatonin Synthesis: Multiplicity of regulation. **Kynurenine and Serotonin Pathways.** Plenum press N.Y. 149-158, 1991.

94. Reiter R., Guerrero J., Garcia J., Acuña-Castroviejo J. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and ageing relation to Melatonin. ***Annals of the New York Academy of Science***. 854: 410-424, 1998.
95. 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.
96. Romero F., Bosch-Morell F., Romero M., Jareno E., Romero E., Marin N., Roma J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. ***Environ Health Perspect***. 106 (5): 1229-34, 1998.
97. Rosato R., Macasaet F., Jahrling PB. Enzyme-linked immunosorbent assay detection of immunoglobulins G and M to Venezuelan equine encephalomyelitis virus in vaccinated and naturally infected humans. ***J Clin Microbiol***. 26: 421-425, 1988.
98. 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.
99. Sapan C, Lundblad R, Price N. Review. Colorimetric protein assay techniques. ***Biotechnol Appl Biochem***; 29: 1-14, 1999.
100. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. ***J Vasc Res***. 31:131-43,1994.
101. Scheld W., Arinstrong D., Hughes J. ***Emerging Infections*** ASM press. Washington D.C. 27-39, 1998.
102. Schoneboom B., Catlin K., Marty A., Grieder F. Inflammation is a component of neurodegeneration in response to Venezuelan Equine Encephalitis virus infection in mice. ***J Neuroinmonol*** 109 (2): 132-46, 2000.
103. Skaper S., Floreani M., Ceccon M., Faccil L., Giusti P. Excitotoxicity, oxidative stress and the neuroprotective potencial of Melatonin. ***Annals of the New York Academy of Science***. 890: 107-118, 1999.
104. Stankov B., Fraschini F., Reiter R. Melatonin binding sites in the central nervous system. ***Brain Res Rev***. 16: 245-256, 1991.
105. Stuehr DJ., Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 82:7738-42,1985
106. Takahashi M., Ishida T., Traub O., Corson MA., Berk BC. Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. ***J Vasc Res***. 34:212-219,1997

107. Tweardy DJ., Glazer EW., Mon PI. Modulation by tumor necrosis factor- α of human astroglial cell production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (G-CSF). **J Neuroimmunol.** 32: 269-278, 1991.
108. Valero N. ARBOVIRUS DE LA REGIÓN. Editorial. **Invest Clin.** Vol. 37(1): 1-3. 1996.
109. Valero N., Henriquez R., Hernández C., Pomeda O., Romero M. Agentes virales en pacientes con procesos infecciosos del sistema nervioso central. **Invest Clin.** 42 (4): 255-267, 2001
110. 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
111. Valero N., Bonilla E., Pons H. Melatonin induces changes to serum cytokines in mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 96: 348-351, 2002.
112. Valero, N. La Melatonina: ¿mito o realidad?. **Invest Clin.** 39(4): 253-255. 1998.
113. 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.
114. 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.
115. Walton T., Grayson M. Venezuelan Equine Encephalomyelitis, the Arboviruses: **Epidemiology and Ecology.** Chap 46. Vol IV. 203-233, 1988.
116. Weaver S., Bellew L., Ricco-Hesse R. Phylogenetic analysis of alphaviruses in the VEE complex and identification of the source of epizootic viruses. **Virology J.** 191: 282-290, 1992.
117. Wesseling Sl., Levine B., Fox Rj. Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alpha virus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. **J Immunol.** 152: 45-51, 1996.
118. Yang Nc., Lu Lh., Kao Yh., Chau Ly. Hemo oxygenase-1 attenuates interleukin-1beta-induced nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. **J Biomed Sci.** 11(6):799-809, 2004.
119. Zinder S., Bredt D. Biological roles of nitric oxide. **Scientific American** 28-35, 1992.

VIII. ANEXOS

VIII.1.- PUBLICACIONES

- VIII.1.1 Autor Bonilla, E.; **Valero, N.**; Chacín-Bonilla, L.; Pons, H.
 Título MELATONIN PROTECTS MICE INFECTED WITH VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS.
 Revista Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 53: 430-434
 Año 1997
- VIII.1.2 Autor Bonilla E., Rodón C., **Valero N.**, Pons H., Chacín-Bonilla L.,
 García-Tamayo J., Rodríguez Z., Medina S., Añez F.
 Título MELATONIN PROLONGS SURVIVAL OF IMMUNODEPRESSED MICE INFECTED WITH THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS.
 Revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95: 207-210
 Año 2001.
- VIII.1.3 Autor Negrette B., Bonilla E., **Valero N.**, Pons H., García-Tamayo J.,
 Chacín-Bonilla L., Medina S., Añez F.
 Título MELATONIN TREATMENT ENHANCES THE EFFICIENCY OF MICE IMMUNIZATION WITH VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS TC-83.
 Revista Neurochemical Research 26(7): 765-768
 Año 2001.
- VIII.1.4 Autor **Valero N.**, Bonilla E., Pons H., Chacín-Bonilla L., Añez F.,
 García J.
 Título MELATONIN INDUCES CHANGES ON SERUM CYTOKINES IN MICE INFECTED WITH THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS.
 Revista Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 96: 348-351.
 Año 2002.
- VIII.1.5 Autor Bonilla E., **Valero N.**, Chacín-Bonilla L., Pons H., Larreal Y.,
 Espina L., Medina S.
 Título MELATONIN INCREASE INTERLEUKIN 1 BETA AND DECREASE TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA IN THE BRAIN OF MICE INFECTED WITH THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS.
 Revista Neurochemical Research 28(5): 687-692.
 Año 2003.
- VIII.1.6 Autor Bonilla E., **Valero N.**, Medina S.
 Título MELATONIN AND VIRAL INFECTIONS
 Revista J Pineal Res, 36: 73-79.
 Año 2004

- VIII.1.7 Autor **Valero, N.**, Meleán, E., Arias, J., Espina, L., Bonilla, E., Chacín-Bonilla, L, Larreal, Y., Maldonado, M., Reyes, I. Añez, F.
Título *IN VITRO* MELATONIN TREATMENT DECREASES NITRIC OXIDE LEVELS IN MURINE SPLENOCYTES DURING THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS INFECTION.
Revista Neurochemical Research Vol 30 (11):1439-1442
Año 2005
- VIII.1.8 Autor **Nereida Valero**, Luz Marina Espina, Jesús Mosquera
Título MELATONIN DECREASES NITRIC OXIDE PRODUCTION, INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION AND LIPID PEROXIDATION INDUCED BY VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS VIRUS IN NEUROBLASTOMA CELL CULTURES
Revista Neurochemical Research 31:925–932
Año Neurochem Res DOI: 10.1007/s11064-006-9098-7, 2006.
- VIII.1.9 Autor **Nereida Valero**, Luz Marina espina, Ernesto Bonilla, Jesús Mosquera
Título MELATONIN DECREASES NITRIC OXIDE PRODUCTION AND LIPID PEROXIDATION AND INCREASES INTERLEUKIN 1-BETA IN THE BRAIN OF MICE INFECTED BY THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS
Revista Journal of Pineal Research42 (2): 107-112.
Año J Pin Res DOI: 10.1111/j1600-079x.2006.00381.x, 2006.
- VIII.1.10 Autor **Nereida Valero**, Anais Nery, Ernesto Bonilla, Luz Marina Espina, Leonor Chacin-Bonilla, Florêncio Añez, Mery Maldonado, Eddy Melean
Título ANTAGONISTIC EFFECT OF LUZINDOLE IN MICE TREATED WITH MELATONIN DURING THE INFECTION WITH THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS
Revista Neurochemical Research.
Año Aceptado para publicación en 2008.

VIII.2.- COMUNICACIONES ENVIADAS A EVENTOS CIENTÍFICOS

- VIII.2.1 Autor **Valero, N.**; Bonilla, E, Pons, H; Chacin-Bonilla, L; Añez, F; Arias, J; Rodriguez, Z.
Título del Trabajo "INFLUENCIA DE LA MELATONINA SOBRE LA PRODUCCION DE INTERFERON GAMMA E INTERLEUCINA 2 EN RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA".
Congreso VIII Jornadas Científicas de la Facultad de Medicina " Dr. Marco Tulio Torres Vera"
Fecha Octubre de 1997.
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela
- VIII.2.2 Autor Medina, S; Bonilla, E; **Valero, N.**; Chacin-Bonilla, L; Añez, F; Arias, J; Giraldoth, D
Título del Trabajo EFECTO DE LA LUZ (2500 LUX) SOBRE LOS NIVELES DE MELATONINA EN SUERO DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA"
Congreso VIII Jornadas Científicas de la Facultad de Medicina " Dr. Marco Tulio Torres Vera"
Fecha Octubre de 1997.
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela
- VIII.2.3 Autor Bonilla, E; **Valero, N.**; Pons, H; Chacin-Bonilla, L
Título del Trabajo "MELATONIN PROTECTS MICE INFECTED WITH VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS"
Congreso Annual Meeting of Society of Neuroscience.
Fecha Octubre 25-30, 1997.
Lugar New Orleans, USA.
- VIII.2.4 Autor **Valero, N.**; Bonilla, E, Pons, H; Chacin-Bonilla, L; Añez, F; Arias, J.
Título del Trabajo "MELATONIN INDUCED CHANGES ON THE PRODUCTION OF INTERFERON GAMMA E INTERLEUKIN 2 IN MICE INFECTED WITH VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS"
Congreso 46 th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene
Fecha Diciembre 7-11, 1997.
Lugar Orlando, Florida, USA.
- VIII.2.5 Autor Medina, S, Bonilla, E, **Valero, N.**; Añez, F, Chacin- Bonilla, L.
Título del Trabajo "HIGH INTENSITY LIGTH (2550 LUX) INCREASE THE LEVELS OF SERUM MELATONIN IN MICE INFECTED WITH VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS".
Congreso 46 th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene
Fecha Diciembre 7-11, 1997.
Lugar Orlando, Florida, USA.

- VIII.2.6 Autor **Valero, N.**; Bonilla, E, Pons, H; Chacin-Bonilla, L; Añez, F; Arias, J; Rodriguez, Z
 Título del Trabajo “PRODUCCION DE INTERFERON GAMMA E INTERLEUCINA 2 EN RATONES TRATADOS CON MELATONINA E INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA”.
 Congreso VIII Jornadas Científicas Nacionales de la Facultad Experimental de Ciencias
 Fecha Julio 6-10, 1998.
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.7 Autor **Valero, N.**; Bonilla, E, Pons, H; Chacin-Bonilla, L; Añez, F; Arias, J; Rodriguez, Z.
 Título del Trabajo “EL TRATAMIENTO CON DEHIDROEPIANDROSTERONA Y MELATONINA INCREMENTA LA RESPUESTA INMUNITARIA HUMORAL DE RATONES VACUNADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA TC-83 ”.
 Congreso VIII Jornadas Científicas Nacionales de la Facultad Experimental de Ciencias
 Fecha Julio 6-10, 1998.
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.8 Autor **Valero, N.**; Rodón, C; Bonilla, E; Añez, F; Estévez, J; Rodriguez, Z
 Título del Trabajo “EFECTO DE LA MELATONINA EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA”.
 Congreso XXV Jornadas venezolanas de Microbiología “Dr. Gustavo Prieto”
 Fecha Noviembre, 4-7 de 1998.
 Lugar Puerto La Cruz, estado Anzoátegui-Venezuela.
- VIII.2.9 Autor **Valero, N.**; Costa, L; Añez, F; Estévez, J; Rodriguez, Z
 Título del Trabajo “DEHYDROEPIANDROSTERONE AND MELATONIN TREATMENT INCREASE HUMORAL RESPONSE OF MICE VACCINATED WITH TC-83 VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS”.
 Congreso XXV Jornadas venezolanas de Microbiología “Dr. Gustavo Prieto”
 Fecha Noviembre, 4-7 de 1998.
 Lugar Puerto La Cruz, estado Anzoátegui-Venezuela.
- VIII.2.10 Autor **Valero, N.**; Bonilla, E, Pons, H; Chacin-Bonilla, L; Añez, F; Arias, J; Rodriguez, Z
 Título del Trabajo “PRODUCCIÓN DE INTERFERON GAMMA E INTERLEUCINA 2 EN RATONES TRATADOS CON MELATONINA E INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA”
 Congreso XLVIII Convención Anual de AsoVAC.
 Fecha Noviembre, 9-13, 1998.
 Lugar Maracaibo, estado Zulia- Venezuela

- VIII.2.11 Autor Negrette, B; Bonilla, E; **Valero, N.**; Añez, F; Chacin-Bonilla, L; Arias, J; Rodriguez, Z
 Título del Trabajo "EL TRATAMIENTO CON DEHIDROEPIANDROSTERONA Y MELATONINA PROTEGE A RATONES VACUNADOS CONTRA EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA".
 Congreso XLVIII Convención Anual de AsoVAC.
 Fecha Noviembre, 9-13, 1998.
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela
- VIII.2.12 Autor Negrette, B; Bonilla, E, **Valero, N.**; Añez, F, Chacin-Bonilla, L.
 Título del Trabajo "DEHYDROEPIANDROSTERONE AND MELATONIN TREATMENT INCREASE HUMORAL RESPONSE OF MICE VACCINATED WITH TC-83 VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS".
 Congreso 8 the International Congress of Infectious Diseases.
 Fecha Mayo 15-18, 1998.
 Lugar Boston, Massachusetts, USA.
- VIII.2.13 Autor Negrette, B; Bonilla, E, **Valero, N.**; Añez, F; Chacin-Bonilla, L.; Pons, H.; García, J.; Rodriguez, Z.
 Título del Trabajo "DEHYDROEPIANDROSTERONE AND MELATONIN TREATMENT PROTECTS MICE AGAINST LIVE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS POST VACCINATION CHALLENGE".
 Congreso 47 th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
 Fecha 18-22 de Octubre, 1998.
 Lugar San Juan, Puerto Rico.
- VIII.2.14 Autor Bonilla, E; **Valero, N.**; Añez, F; Chacin-Bonilla, L.; Pons, H.; García, J.; Negrette, B.
 Título del Trabajo "MELATONIN INCREASES BRAIN LEVELS OF IL-1 β AND DECREASES TNF- α DURING MURINE THE INFECTION WITH VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS VIRUS".
 Congreso 47th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
 Fecha 18-22 de Octubre, 1998.
 Lugar San Juan, Puerto Rico.
- VIII.2.15 Autor **Valero, N.**, Rodón C., Bonilla E., Chacín-Bonilla L., Añez F., Espina L., Rodriguez, Z., Negrette B.
 Título del Trabajo "INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS EXPERIMENTALMENTE E INFECTADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA"
 Congreso IX Jornadas Científicas de la Facultad de Medicina "Lic. Francisca Estrada Porras". I Congreso Universitario de las Ciencias de la Salud "Dr. Humberto Fernández Morán".
 Fecha 20-24 Septiembre de 1999,
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.

- VIII.2.16 Autor **Valero, N.**, Bonilla E., Añez F., Pons H., García J., Chacín-Bonilla L., Espina L., Rodríguez, Z.
 Título del Trabajo “EFECTO DE LA MELATONINA EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA”
 Congreso XXVI Jornadas Venezolanas de Microbiología Dr. José Esparza. “Infecciones emergentes”.
 Fecha 1-4 noviembre de 1999.
 Lugar Valencia, estado Carabobo-Venezuela.
- VIII.2.17 Autor **Valero, N.**, Bonilla E., Pons H., García-Tamayo J., Añez F., Rodríguez Z., Espina L., Chacín-Bonilla L.
 Título del Trabajo “EFFECT OF MELATONIN IN EXPERIMENTAL MODELS OF VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS”.
 Congreso 48th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and Hygiene
 Fecha 28 de noviembre a 2 diciembre, 1999
 Lugar Washington D.C, U.S.A.
- VIII.2.18 Autor Bonilla E., Rodón C., **Valero, N.**, Pons H., Chacín-Bonilla L., García J., Añez F., Rodríguez Z
 Título del Trabajo “EFFECTS OF MELATONIN IN IMMUNOSUPPRESSED MICE INFECTED WITH THE VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS”.
 Congreso 9th International Congress of Infectious Diseases.
 Fecha 10-13 de Abril, 2000
 Lugar Buenos Aires, Argentina
- VIII.2.19 Autor Arias J., Meleán E., Bonilla E., Chacín-Bonilla L., Pons H., **Valero N.**
 Título del Trabajo EFECTO DE LA MELATONINA EN LA RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR DURANTE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
 Congreso X Congreso Venezolano de Bioanálisis. XIII Jornadas de Bioanalistas Especialistas.
 Fecha 27-30 de junio 2001.
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.20 Autor Arias J., Meleán E., **Valero N.**, Pons H., Bonilla E., Chacín-Bonilla L.
 Título del Trabajo INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA Y PRODUCCIÓN DE INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1B) EN ESPLENOCITOS DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA
 Congreso X Jornadas Científicas de la Facultad de Medicina “Dra. Haydee Parra de Soto”.
 Fecha 29 de octubre - 2 de noviembre, 2001.
 Lugar

- VIII.2.21 Autor Bonilla E., Medina S., **Valero N.**, Chacín-Bonilla L., Añez F., Giraldoth D., Arias J., Espina G., Díaz S.
 Título del Trabajo HIGH INTENSITY LIGHT INCREASES OLFATORY BULB MELATONIN IN VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALOMYELITIS INFECTIONS.
 Congreso 50th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene.
 Fecha 11-15 de noviembre, 2001.
 Lugar Atlanta, Georgia, USA
- VIII.2.22 Autor Meleán E., Arias J., Espina L., Larreal Y., Maldonado M., Reyes I., Añez F., **Valero N.**
 Título del Trabajo EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE ESPLENOCITOS MÚRIDOS DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
 Congreso LII Convención Anual de AsoVAC.
 Fecha 17 a 22 de noviembre 2002.
 Lugar Barquisimeto, estado Lara-Venezuela.
- VIII.2.23 Autor Meleán E., **Valero N.**, Montero E., Reyes I., Chávez J., González K., Andrade D., Finol G., Añez F., Larreal Y., Añez G., Estévez J., Arias J., Espina L., Maldonado M., Bonilla E., Chacín-Bonilla L.
 Título del Trabajo PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE ESPLENOCITOS MÚRIDOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV) Y TRATADOS CON MELATONINA
 Congreso LIII Convención Anual de AsoVAC.
 Fecha 25 al 29 de noviembre de 2003
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.24 Autor Chávez J., **Valero N.**, González K., Andrade D., Finol G., Añez F., Larreal Y., Añez G., Estévez J., Arias J., Espina L., Maldonado M., Meleán E., Montero E., Reyes I., Bonilla E., Chacín-Bonilla L.
 Título del Trabajo EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE EL ÓXIDO NÍTRICO EN CULTIVO DE ESPLENOCITOS MÚRIDOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV).
 Congreso LIII Convención Anual de AsoVAC.
 Fecha 25 al 29 de noviembre de 2003
 Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.25 Autor Meleán E., **Valero N.**, Bonilla E., Arias J., Larreal Y., Pons H., Añez F., Maldonado M., Chacín-Bonilla L., Espina L.
 Título del Trabajo EFECTO DE LA MELATONINA (MLT) SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA PROLIFERACIÓN *IN VITRO* DE ESPLENOCITOS MÚRIDOS DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV).
 Congreso X Jornadas Nacionales de Investigación Científica de la Facultad Experimental de Ciencias.

- Fecha 26 al 29 de Octubre de 2004.
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.26 Autor Arias J., **Valero N.**, Bonilla E., Pons H., Meleán E., Chacín-Bonilla, L., Espina L., Maldonado M., Añez G., Reyes I., Larreal Y.
Título del Trabajo INFLUENCIA DE LA MELATONINA EN LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA Y PRODUCCIÓN DE INTERLEUCINA 2 (IL-2) E INTERLEUCINA 1 BETA (IL-1 β) EN ESPLENOCITOS DE RATONES INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV).
Congreso X Jornadas Nacionales de Investigación Científica de la Facultad Experimental de Ciencias.
Fecha 26 al 29 de Octubre de 2004.
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.27 Autor Espina L., Maldonado M., Añez G., Finol G., Bravo T., **Valero N.**, González K.,
Título del Trabajo PRODUCCIÓN DE OXIDO NÍTRICO Y MALONDIALDEHIDO EN RATONES TRATADOS CON MELATONINA (MLT) E INFECTADOS CON ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV).
Congreso X Jornadas Nacionales de Investigación Científica de la Facultad Experimental de Ciencias.
Fecha 26 al 29 de Octubre de 2004.
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.28 Autor **Valero N.**, Bonilla E., Arias J., Larreal Y., Reyes I., Espina L., Pons H., Añez F., Meleán E., Maldonado M., Añez G., Chacín de Bonilla L.
Título del Trabajo EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA (MLT) EN MODELOS EXPERIMENTALES DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA (EEV).
Congreso X Jornadas Nacionales de Investigación Científica de la Facultad Experimental de Ciencias.
Fecha 26 al 29 de Octubre de 2004.
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.29 Autor Espina LM., **Valero N.**, Meleán E., González K., Maldonado M., Bonilla E.
Título del Trabajo PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN SUERO Y ESPLENOCITOS MÚRIDOS DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA BAJO TRATAMIENTO CON MELATONINA
Congreso XV Jornadas Nacionales de Infectología. XII Jornadas Zulianas.
Fecha 14 al 16 de Octubre de 2004
Lugar Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.
- VIII.2.30 Autor Espina LM., **Valero N.**, Bonilla E., Maldonado M., Arias J., González K., Chávez J.

- Título del Trabajo "PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN SUERO Y ESPLENOCITOS MÚRIDOS DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA BAJO TRATAMIENTO CON MELATONINA"
- Congreso XV Jornadas Científicas de la sociedad venezolana de Bioanalistas Especialistas.
- Fecha 2-5 de Julio de 2005.
- Lugar Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela.
- VIII.2.31 Autor LM. Espina, **N. Valero**, E. Bonilla, E. Montero, J. Chavez, E. Finol.
- Título del Trabajo CONCENTRACIONES DE OXIDO NITRICO EN SUERO Y CEREBRO DE RATONES TRATADOS CON MELATONINA E INFECTADOS CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
- Congreso II Jornadas Académicas Facultad de Ciencias Veterinarias LUZ.
- Fecha 17 de marzo de 2006.
- Lugar Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
- VIII.2.32 Autor **Valero N**, Espina LM, Mosquera J.
- Título del Trabajo MELATONIN DECREASES NITRIC OXIDE PRODUCTION AND LIPID PEROXIDATION INDUCED BY VENEZUELAN ENCEPHALITIS EQUINE VIRUS IN NEUROBLASTOMA CELL CULTURES.
- Congreso 12 Th International Congress on Infectious Diseases
- Fecha 15-18 de Junio de 2006.
- Lugar Lisboa, Portugal.
- VIII.2.33 Autor Nery A, **Valero N**, Bonilla E, Espina L, Chacín-Bonilla L, Añez F, Maldonado M, Meleán E.
- Título del Trabajo EFECTO ANTAGONISTA DEL LUZINDOLE EN RATONES TRATADOS CON MELATONINA DURANTE LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE ENCEFALITIS EQUINA VENEZOLANA.
- Congreso XXX Jornadas Venezolanas de Microbiología "Nicole y Francisco Yegres".
- Fecha 5-7 de Noviembre de 2006.
- Lugar Coro, Estado Falcón, Venezuela.