
Incremento de Interleucina-1 beta, Interferon gamma y Factor de Necrosis Tumoral alfa en suero y cerebro de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

Nereida Valero¹, Ernesto Bonilla^{2,3}, Luz Marina Espina¹, Mery Maldonado¹, Elsa Montero⁴, Florencio Añez¹, Alegría Levy¹, John Bermudez¹, Eddy Meleán¹ y Anais Nery¹.

¹Sección de Virología, ²Sección de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia,

³Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC-Zulia) y

⁴Hospital “Dr. Adolfo Pons”, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Encefalitis Equina Venezolana, citocinas, sistema nervioso central, suero.

Resumen. Diversos esfuerzos han sido dirigidos a fin de esclarecer los principales mecanismos de protección y recuperación en las infecciones virales agudas y el posible papel de las citocinas involucradas en la respuesta inmunitaria primaria inducida por una cepa epizootica del virus de Encefalitis Equina Venezolana (EEV). En el presente estudio se determinaron las concentraciones de citocinas TH1 Interleucina-2 (IL-2) e Interferon-gamma (IFN- γ), TH2 Interleucina-4 (IL-4), proinflamatorias (IL-1 β) y el Factor de Necrosis Tumoral -alfa (TNF- α) en suero y cerebro de ratones infectados con el virus de EEV a diferentes períodos de infección. Se utilizaron ratones NMRI albinos machos infectados con una suspensión (10 DL₅₀) de la cepa Guajira del virus de EEV, y un grupo control (sin infectar). En los días 1, 3 y 5 post-infección, se extrajo sangre completa de ratones para la obtención de suero y el cerebro previa perfusión, para la obtención de homogeneizados cerebrales. En ambas muestras se determinaron IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-1 β , y TNF- α por la técnica de ELISA. Se observó un incremento significativo ($p < 0,01$) en suero y homogeneizados cerebrales al 1^{er}, 3^{er} y 5^{to} día post-infección en las concentraciones de IL-1 β , IFN- γ y TNF- α , al compararlos con el grupo control. La cuantificación de IL-2 e IL-4, no arrojaron diferencias estadísticamente significativas al ser comparados con los controles. Estos resultados sugieren que la IL-1 β , IFN- γ y TNF- α , podrían estar involucradas en la respuesta inmunitaria temprana al virus de EEV durante la infección primaria.

Increase of Interleukin-1 Beta, Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor Alpha in serum and brain of mice infected with the Venezuelan Equine Encephalitis virus.

Invest Clin 2008; 49(4): 457 - 467

Key words: Venezuelan Equine Encephalitis, cytokines, central nervous system, serum.

Abstract. Considerable efforts have been directed to clarify the main protective and recovery mechanisms in acute viral infections and, the possible role of the cytokines involved in the primary immune response induced by an epizootic strain of the Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) virus. This study examined the levels of TH1 cytokines Interleukin-2 (IL-2) and Interferon-gamma (IFN- γ), TH2 cytokines Interleukin-4 (IL-4) and proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α) in serum and brain of mice infected with the VEE virus during different post infection periods. NMRI albino male mice infected with a suspension (10 DL₅₀) of the Guajira strain of the VEE virus, and a control group (without infection) were used. At one, 3 and 5 days post-infection, whole blood and brains were extracted to obtain sera and brain homogenates, respectively. IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-1 β and TNF- α were determined by ELISA. A significant increment in the levels of IL-1 β , IFN- γ and TNF- α was observed ($p < 0.01$) in serum and brain homogenates at 1, 3 and 5 day post-infection, when compared with the control group. The levels of IL-2 and IL-4 did not show any significant statistical difference when compared to the controls. These results suggest that IL-1 β , IFN- γ and TNF- α , could be involved in the early immunitary response to VEE virus during the primary infection.

Recibido: 07-07-2006. Aceptado: 27-03-2008.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad específica en las infecciones virales está mediada por una combinación de mecanismos inmunitarios humorales y celulares. Los anticuerpos se producen y son efectivos en contra de los virus sólo durante el estadio extracelular de la vida de estos microorganismos. Los virus pueden ser extracelulares al inicio del curso de la infección antes de entrar a la célula huésped o en el caso de virus citopáticos una vez que son liberados de las células infectadas lisadas, por lo que en su estadio intracelular estos virus no son detectados por los anticuerpos. Su destrucción está media-

da por la activación de mecanismos que desencadenan una respuesta celular (linfocitos T) controlando la infección o la replicación hasta la aparición de una respuesta humoral (linfocitos B) que favorece la síntesis de anticuerpos específicos al agente infectante; no obstante, son capaces de evadir los mecanismos inmunitarios de defensa, contribuyendo así a la patogénesis, al sufrir variaciones antigénicas, inhibir la presentación antigénica a través de la supresión de los genes del Complejo Principal de Histo-compatibilidad (CMH) clase I e inactivar células inmunocompetentes, entre otros (1).

En el sistema nervioso central (SNC), el control de las infecciones virales es una

labor compleja que se cumple a través de mecanismos que controlan y regulan el desarrollo de procesos inflamatorios locales que incluye a la barrera hemato-encefálica (BHE), con limitada capacidad para la presentación de antígenos y la modulación funcional de reacciones inmunitarias por los gangliósidos y astrocitos. Normalmente las células dentro del SNC no expresan antígenos clase I o clase II del CMH. Las células T activadas en la periferia, entran al SNC en forma antígeno no-específica como parte de la rutina de vigilancia inmunológica. Solo las células T específicas para un antígeno presente en el cerebro y médula espinal, son retenidas dentro del SNC (2).

Algunos autores han reportado tal infiltración de linfocitos T, como ocurre en la Encefalitis Rasmussen (RE), un síndrome autoinmunitario que frecuentemente sigue a un episodio infeccioso, que se manifiesta por ataques epilépticos que son refractarios a drogas y requiere de la eliminación quirúrgica de las regiones cerebrales afectadas. El cuadro histológico de dichas regiones es dominado por linfocitos T CD8+ infiltrantes que son frecuentemente puestos en contacto directo con neuronas. Los linfocitos T citotóxicos infiltrantes muestran el uso parcial de receptores indicativo de un proceso específico de antígenos y actualmente representa el mediador más probable de RE. La similitud histomorfológica a encefalitis viral fueron especulaciones ampliamente discutidas. A través del tiempo los enterovirus, virus de Epstein-Barr, herpes simples tipo I y también citomegalovirus han sido detectados en tejidos cerebrales afectados. En la fase final la causa infecciosa desaparece como para todas las otras enfermedades autoinmunitarias con una sospecha de patogénesis viral (3).

Esto ha contribuido a la consideración de que el SNC y el sistema inmunitario interactúan de manera particular (4); de allí la importancia de conocer los mecanismos re-

lacionados a la defensa primaria y específica del hospedero ante una infección viral.

Además, los procesos inflamatorios del SNC, tales como la encefalitis, se caracterizan por presentar un incremento local en la concentración de las citocinas, particularmente de la Interleucina 1-Beta (IL-1 β) y el Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), las cuales pueden activar células endoteliales, y de esta manera, promover la migración de neutrófilos al interior del sitio inflamado. La cascada de eventos se inicia con activación de linfocitos T, lo cual incluye la liberación de potentes citocinas (IFN- γ , IL-2, TNF) y la movilización de macrófagos que no solamente atacan al virus sino también al hospedador, causando daños severos en tejidos y vasos sanguíneos (5).

Por otro lado, la Encefalitis Equina Venezolana (EEV) es una infección causada por un virus altamente neurotrópico perteneciente al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae* (6, 7). La infección viral por EEV, es transmitida por mosquitos *Aedes aegypti*, *taeniarhynchus* (8), por miembros de la familia *Culicidae* y por dípteros nematoceros de la familia *Simulidae*; los roedores, burros, caballos, el ganado vacuno, murciélagos, posiblemente las aves y los perros, se consideran reservorios del virus de EEV (9).

Estudios de la respuesta inmunitaria a la infección por el virus de EEV han sido enfocados principalmente para la generación de vacunas o cepas atenuadas en la producción de anticuerpos neutralizantes con la finalidad de eliminar el virus en el hospedador. Sin embargo, la inmunidad mediada por anticuerpos, no es necesariamente el único mecanismo de protección contra la infección por este virus. Investigaciones en las cuales, ratones que fueron tratados con sobrenadante de cultivo de esplenocitos inmunizados, sugieren que la protección contra un ataque letal por el virus de EEV puede ser mediada por la IL-1 y la IL-2 (10).

Tanto el TNF como la IL-1, exhiben efectos antivirales directos que en parte son mediados por inducción de TNF- β o Linfotoxina (LT), el cual es producido por los linfocitos T y otras células, siendo un 30% homólogo al TNF derivado de los macrófagos y cumple muchas de las mismas funciones. Los efectos biológicos de LT son los mismos que los del TNF, consistente con su unión a los mismos receptores. Sin embargo, debido a que la cantidad de LT sintetizada por los linfocitos T estimulados por antígenos es mucho menor que las cantidades de TNF producidos por los fagocitos mononucleares estimulados por LPS, la LT no es bien detectada en la circulación. Por lo tanto, la LT es una citocina de acción local y no un mediador de injuria sistémica (1).

La IL-2 es un factor de crecimiento auto y paracrino que secretan los linfocitos T activados y es esencial para la proliferación clonal de la célula T. Las células T que son estimuladas por la IL-2, muestran un aumento en la citotoxicidad y producen IFN- γ y β y TNF- β , además de factores de crecimiento de la célula B como la IL-4 e IL-6. La IL-2 estimula a las células NK que tienen actividad citolítica aumentada (11).

Estudios de la respuesta inmunitaria a la vacuna TC-83 en ratones identificaron una respuesta inmunitaria mediada por el patrón TH1, con activación local de células TCD4⁺ y CD8⁺, siendo las células T CD4⁺ el tipo de células predominante después de la linfoblastogénesis virus-específica y que la activación de éstas fue también asociada a una elevación de IL-2 (12).

El IFN- γ (Tipo II) posee cierta actividad antiviral. Es secretado por casi todas las células T CD8 y por algunas T CD4 particularmente las del subgrupo TH1. Es el activador de macrófagos más potente que se conoce. La exposición a IFN- γ aumenta considerablemente la actividad antimicrobiana de los macrófagos y los induce a secretar ci-

tocinas como IL-1, 6, 8 y TNF- α ; además, aumenta la actividad de las TH1 (11).

En relación a la IL-4, su principal fuente celular son los linfocitos T CD4⁺ de la subpoblación TH2, así como también las células mastoides activadas y basófilos. Sus acciones biológicas incluye la estimulación de reacciones mediadas por eosinófilos, células mastoides, estimulación de las células B para la producción de IgE y supresión de reacciones dependientes de los macrófagos. Los anticuerpos IgE juegan un papel en la defensa mediada por eosinófilos contra helmintos e infecciones por artrópodos. La IL-4 promueve el desarrollo de células TH2 en la defensa del hospedador siendo la responsable de la inducción y expansión de esta subpoblación. Esta citocina antagoniza los efectos de activación de macrófagos del IFN- γ , de esta manera inhibe la respuesta inmunitaria mediada por células (1).

Se conoce relativamente poco acerca de los mecanismos patogénicos de muchas infecciones virales; de allí que en el presente trabajo se planteo estudiar, a diferentes estadios postinfección, la respuesta inmunitaria mediada por algunas citocinas TH1, TH2 y proinflamatorias realizando la cuantificación de las mismas tanto en suero como en homogeneizados cerebrales de ratones experimentalmente infectados con el virus de EEV.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos grupos de ratones NMRI albinos machos, de 1-2 meses de edad con un rango de peso de 25-30 gramos, obtenidos del Bioterio del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC); los cuales fueron alimentados "*ad libitum*" en ambiente a temperatura constante de 25°C. Cada animal del grupo experimental, fue infectado intraperitonealmente con 0,05 mL de suspensión viral que contenía 10 dosis

letales 50 (10 DL₅₀) del virus, suspendidas en solución borato salina con albúmina bovina al 0,4%, estéril (13).

Se utilizó la cepa Guajira del virus de EEV. El stock del virus se preparó en células VERO (células de riñón de mono verde africano), a una multiplicidad de infección de 1.0 UFP/cel. El título de infectividad de la cepa inoculada fue de $6,8 \times 10^7$ UFP/mL.

Al 1, 3 y 5 días post-infección, se extrajo sangre completa por punción del seno orbital de los ratones ($n=5/\text{grupo} \times 5$ ensayos) la cual fue centrifugada a 10.000 g x10 minutos para la obtención de suero, dividido en alícuotas y almacenado a -70°C para la determinación de citocinas. Posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para la obtención de sus cerebros, previa perfusión. Los homogeneizados cerebrales se prepararon en suspensiones al 20% en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8, de acuerdo al peso del mismo. Estas suspensiones fueron centrifugadas a 10.000 g x 5 minutos a 4°C , de las cuales se obtuvieron los sobrenadantes para la cuantificación de citocinas.

La determinación de las proteínas en los homogeneizados cerebrales se realizó por el método de Lowry (14).

Determinación de IL-1 β , IL-4, IL-2, TNF- α e IFN- γ

Los niveles de citocinas se determinaron en suero y homogeneizados cerebrales en forma cuantitativa a través de la técnica de ELISA de fase sólida, de alta sensibilidad y especificidad (BioSource Internacional, Inc.) expresándose los resultados en pg/mL.

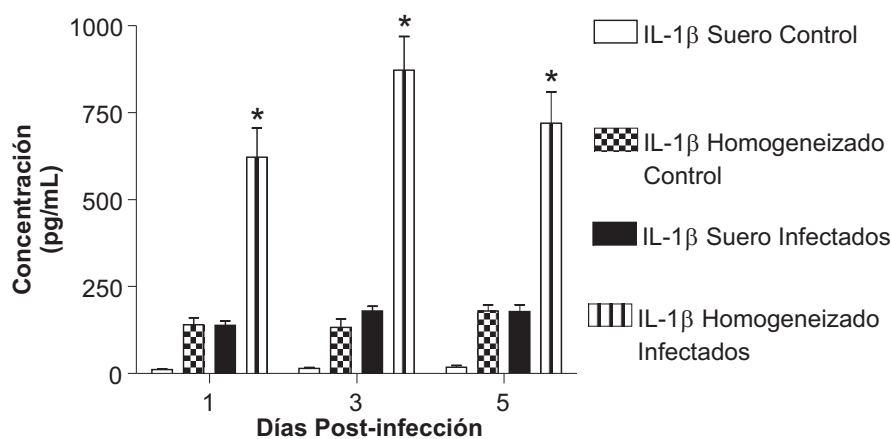
Análisis estadístico

Los datos fueron analizados aplicando el programa estadístico GraphPad 4.0 utilizando el análisis de varianza (ANOVA), seguido del post-test de Bonferroni, considerando significativos a los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se observó un incremento significativo de la IL-1 β ($p < 0,001$) al 1^o, 3^o y 5^o día post-infección en homogeneizados cerebrales de animales infectados con EEV (día 1^o pi = $622 \pm 83,03$ pg/mL; día 3^o pi = $872,4 \pm 96,8$ pg/mL; día 5^o pi = $720 \pm 90,2$ pg/mL), al ser comparados con el resto de los grupos (Fig. 1).

Los resultados obtenidos para las concentraciones de TNF- α arrojaron un signifi-



* $p < 0,001$ al compararlo con el resto de los grupos. ^a pg/mg de proteínas

Fig. 1. Concentraciones de IL-1 β en suero y homogeneizados cerebrales^a de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

cativo aumento ($p < 0,001$) en suero (día 1° pi = $365 \pm 66,91$ pg/mL; día 3° pi = $392,7 \pm 84,14$ pg/mL; día 5° pi = $408,3 \pm 76,95$ pg/mL), y homogeneizados cerebrales (día 1° pi = $960,52 \pm 52,1$ pg/mL; día 3° pi = $880 \pm 49,3$ pg/mL; día 5° pi = $1334,9 \pm 60,1$ pg/mL), en el grupo de ratones infectados en todos los periodos pi (Fig. 2), observándose diferencias entre la respuesta local y la sistémica.

Las concentraciones de IFN- γ en ratones infectados con el virus de EEV, tanto en suero (día 1° pi = $2930,0 \pm 212,6$ pg/mL; día 3° pi = $1931,0 \pm 233,2$ pg/mL; día 5°

pi = $2422,0 \pm 347,9$ pg/mL) como en homogeneizados cerebrales (día 1° pi = $2924,0 \pm 190,9$ pg/mL; día 3° pi = $2050,0 \pm 320,2$ pg/mL; día 5° pi = $2706,0 \pm 496,5$ pg/mL) mostraron un incremento significativo ($p < 0,001$) al compararlas con sus respectivos controles. Esta diferencia se mantiene en todos los periodos estudiados, evidenciando que no hubo diferencia en la producción local de esta citocina con respecto a la concentración sistémica (Fig. 3).

En relación a la IL-2 se observaron diferencias ($p < 0,05$) al comparar el grupo de homogeneizados cerebrales de animales

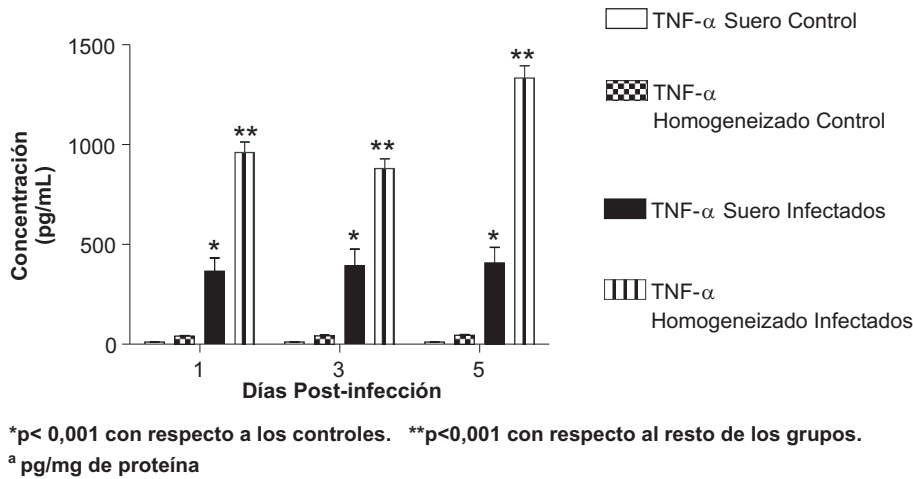


Fig. 2. Concentraciones de TNF- α en suero y homogeneizados cerebrales^a de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

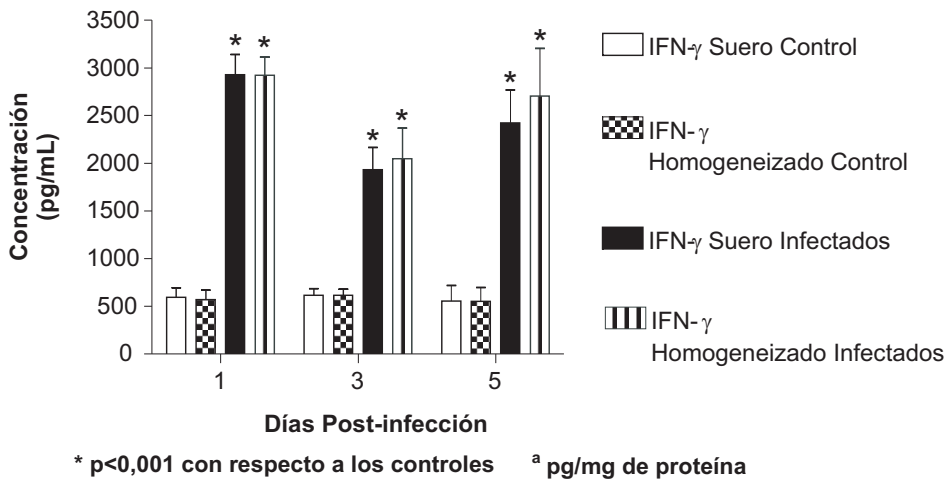


Fig. 3. Concentraciones de Interferon- γ en suero y homogeneizados cerebrales^a de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

no infectados con respecto al suero de animales tanto infectados como no infectados con el virus de EEV al 1, 3 y 5 día pi (1er día pi=80,70 ± 15,54 pg/mL; 3er día pi=57,954 ± 10,89 pg/mL; 5to día pi=54,33 ± 6,88 pg/mL). De igual forma, se observaron diferencias significativas (p<0,05) de homogenizados cerebrales de animales infectados con EEV (1er día pi=52,43 ± 11,46 pg/mL; 3er día pi=73,03 ± 28,86 pg/mL; 5to día pi=57,66 ± 26,36 pg/mL) en relación al suero no infectado y el suero de animales infectados con EEV en todos los períodos estudiados (Fig. 4)

La IL-4 no arrojó diferencias estadísticamente significativas durante los días estudiados (Fig.5).

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente investigación evidencian que la infección por el virus de EEV desencadena un proceso inflamatorio en el SNC de ratones infectados con este agente viral caracterizado por el aumento de la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1β y TNF-α, tanto en

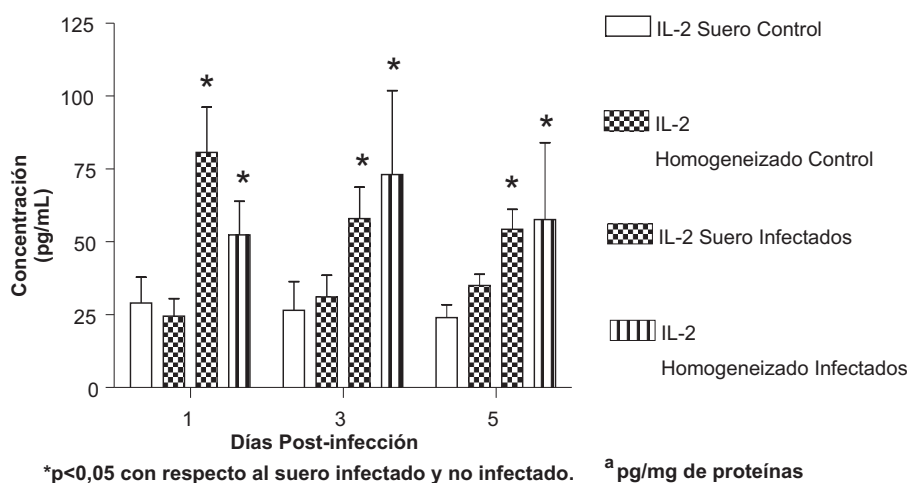


Fig. 4. Concentraciones de IL-2 en suero y homogeneizados cerebrales^a de ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

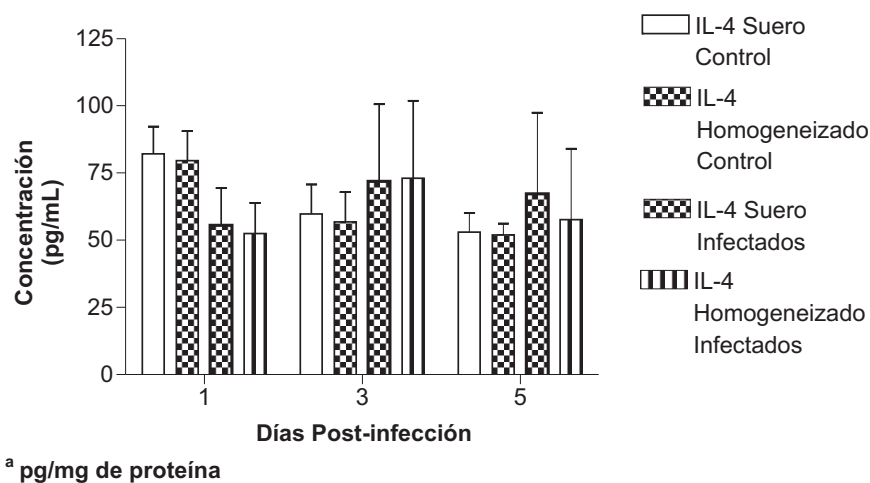


Fig. 5. Concentraciones en suero y homogeneizados cerebrales^a de IL-4 en ratones infectados con el virus de Encefalitis Equina Venezolana.

siero como en homogeneizados cerebrales. Así como también se demostró síntesis incrementada del IFN- γ asociada a esta infección, hallazgo que concuerda con lo reportado por Greider y col. (15) en ratones infectados con el virus de EEV, en los cuales observaron que la expresión génica de esta citocina, se encuentra aumentada en relación a su control.

A pesar que los arbovirus, son la causa más común conocida de encefalitis, el papel exacto de la BHE es escasamente conocido; sin embargo, el incremento de su permeabilidad, aparece como un componente vital de la patología encefalítica viral (16)

Los eventos fisiopatológicos que ocurren con la ruptura de la BHE, probablemente son comunes a muchas formas de encefalitis viral. Esto sugiere que cambios similares pueden ocurrir en humanos infectados con virus de encefalitis de las familias de *Flavivirus* y *Togavirus*, tales como Virus de West Nile o Virus de EEV (16).

En la última década, Paul y col. (17), han referido la elevada regulación natural de la respuesta inmunitaria en el SNC como "privilegio inmunitario", el cual se refiere a un control activo de la respuesta inmunitaria en el cerebro. En el contexto del parénquima cerebral, las células presentadoras de antígeno; así como también otras células de la glía y las neuronas por sí mismas, modulan las respuestas de las células T, orientado hacia una función neuroprotectora y en menor grado hacia una función destructiva. Además, las neuronas son consideradas que poseen sus propias estrategias para limitar la replicación y propagación de virus citopáticos. Esas estrategias favorecen la eliminación no citolítica de los virus o promueven el establecimiento de una infección persistente no citolítica. El IFN- γ es considerado como un importante contribuyente de la eliminación de manera no citolítica, aunque aún falta por determinar como actúa (17). Hausmann y col. (18), también

han demostrado, en modelos experimentales, que el IFN- γ juega un papel importante en la resistencia del hospedador contra infecciones del SNC producidas por el virus Borna. Además, sugieren que el IFN- γ podría funcionar como un factor neuroprotector que probablemente limitaría la pérdida de neuronas en el curso de la respuesta inmunitaria antiviral en el cerebro.

Las elevadas y sostenidas concentraciones de IFN- γ en suero y homogeneizados cerebrales observadas en el presente estudio sugieren la preservación de la integridad neuronal de los modelos murinos infectados con el virus de EEV, inhibiendo la diseminación del virus en el SNC por eliminación o *clearance* y sustentando la hipótesis de que el IFN- γ juega un papel crítico en la protección contra esta infección.

En relación a esto, Parra y col. (19) demostraron el papel potencial del IFN- γ como mediador para controlar la replicación viral en oligodendroglías de ratones deficientes de secreción de dicha citocina e infectados con el virus de hepatitis, cepa JHM (JHMV). Estos ratones exhibieron sintomatología clínica y mortalidad incrementada asociadas a la persistencia del virus, demostrando incapacidad para controlar la replicación viral.

Otros autores han estudiado el papel del IFN- γ , tal y como lo demuestran Rodríguez y col. (20), quienes evaluaron el papel del IFN- γ en la protección neuronal por infección del SNC posterior a daño inducido por virus en ratones IFN- $\gamma^{-/-}$ e IFN- $\gamma^{+/+}$ con haplotipo H-2^b del complejo principal de histocompatibilidad (HMC) e infectados intracerebralmente con el virus Theiler de encefalitis murina. Los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$ desarrollan persistencia viral en células gliales de la materia blanca y exhibieron desmielinización asociada a médula espinal, lo cual provocó muerte y deficiencias neurológicas severas a los 16 días de infección al compa-

rarlos con los controles, evidenciando que el IFN- γ ejerce un efecto neuroprotector.

De igual forma, la producción de TNF- α ha sido asociada a efectos tanto beneficiosos como perjudiciales. En relación a esto, ha sido reportado por algunos autores como beneficioso debido a que el paso de TNF- α sérico a través de la barrera de la médula espinal, después de una injuria en la misma, permite un perfil de citocinas óptimo, específico de tiempo y región, bloqueando efectos deletéreos, mientras refuerza los efectos beneficiosos, que podrían facilitar su restablecimiento funcional (21).

Sin embargo, para otros autores, podría llegar a ser perjudicial tal y como lo describe Schoneboom y col.(22), los cuales obtuvieron niveles elevados de TNF- α en cultivos de astrocitos infectados con el virus de EEV. En otro estudio, realizado por estos investigadores (23), se evidenció un incremento en la producción de múltiples genes proinflamatorios entre ellos el TNF- α , por lo cual sugieren que la respuesta inflamatoria inducida por éste, podría contribuir a la neurodegeneración en la infección por EEV.

En el presente estudio se observó una elevación en las concentraciones séricas de TNF- α , los cuales se incrementaron a medida que transcurrían los días post-infección; en los homogeneizados cerebrales estas concentraciones se encontraron aún más elevadas, lo cual indicaría un daño potencialmente mayor en el SNC provocando probablemente daño neurológico por citotoxicidad celular, alteración en la permeabilidad vascular y en consecuencia una elevación en la tasa de mortalidad de los ratones infectados.

La IL-1 β es una citocina proinflamatoria que actúa como mediador en una gran cantidad de patologías del SNC. 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) (24). En este estudio, la elevada producción sérica y cerebral en ratones infectados por el virus de EEV pareciera responder a la actividad antiviral de esta citocina. Algunos autores (25) reportan en el suero de ratones infectados con el virus de EEV y tratados con melatonina (MLT), aumento de IL-1 β , y sugieren que juega un papel relevante en la resolución de la infección. De igual manera, Bonilla y col. (26) han sugerido que un descenso en los niveles de TNF- α , con un aumento en los de IL-1 β estimulados por la MLT en el cerebro de ratones infectados con el virus de EEV, pueden explicar entre otros aspectos, el incremento en la sobrevivencia de los animales infectados tratados con MLT.

En nuestros resultados, se evidencia que la IL-4 no arrojó variaciones importantes en su concentración, por lo cual se sugiere que la infección por el virus de EEV no estimula una respuesta inmunitaria dependiente del patrón TH2 a través de la IL-4. Sin embargo, es necesario considerar la posibilidad que durante este estudio la replicación viral haya sido aumentada, lo suficiente como para permitir que se activaran los mecanismos inmunitarios necesarios para la expresión de dichas citocinas. Por otro lado, en estudios posteriores, deben evaluarse otras citocinas pertenecientes a estos patrones a fin de determinar si ciertamente este virus es capaz de inhibir la producción de las citocinas que intervienen en la respuesta TH2.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, demuestran que la infección causada por el virus de EEV, activa la producción de IL-1 β , IFN- γ y TNF- α en los homogeneizados cerebrales, posiblemente por producción de estas citocinas en el tejido cerebral, lo cual probablemente contribuye a una elevación sérica de dichas citocinas, sugiriendo que las mismas podrían estar involucradas en la respuesta inmunitaria temprana al

virus de EEV durante la infección primaria. Se hace necesario, realizar estudios posteriores que ayuden a esclarecer si el incremento de producción de IL-1 β y TNF- α e IFN- γ , es el producto de producción local en el SNC ó que la ruptura de la BHE permite el paso de las citocinas antes mencionadas y ello contribuya o no a la patogénesis de la infección por EEV.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES Proyecto N° CC-0141-05) y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT Proyecto N° 1998003550), por el financiamiento otorgado.

REFERENCIAS

1. **Abbas A, Lichtman AJ.** Cellular and Molecular Immunology, 5^{ta} Edition (USA): Elsevier Science; 2003, p 266-270, 356.
2. **Griffin D.** Cytokines in the brain during viral infection: Clues to HIV-associated dementia. *J Clin Invest* 1997; 100:2948-2951.
3. **Merkler D, Horvath E, Bruck W, Zinkernagel RM.** "Viral déjà vu" elicits organ-specific immune disease independent of reactivity to self. *J Clin Invest* 2006; 116: 1254-1263.
4. **Fabris F, Sgarabotto D, Zanon E, Francavilla F, Zaggia F, Cadrobbi P, Girolami A.** The effect of a single course of alpha-2B-interferon in patients with HIV-related and chronic idiopathic immune thrombocytopenia. *Autoimmunity* 1993; 14: 175-179.
5. **Agamanolis D.** Infections of the nervous system. *Neuropathology*. Available from <http://www.neuropathologyweb.org/chapter5/chapter5dViruses.html>
6. **Organización Panamericana de la Salud.** Sistema de información y vigilancia epidemiológica de la encefalitis venezolana en la región de las Américas. *Rev Panam Salud Pública* 1999; 6(2):128-138.
7. **Mathews J, Roehrig J.** Specificity of the murine T-helper cell immune response to various alphavirus. *J Gen Virol* 1989; 70:2877-2886.
8. **Cupp E, Scherer W, Lok J, Brenner R, Dziem G, Ordoñez J.** Entomological studies at an enzootic VEE virus focus in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 851-859.
9. **Homan E, Zuluaga F, Yuill T, Lorbacher H.** Studies on the transmission of VEE virus by a colombian *Simulidae* (Diptera). *Am J Trop Med Hyg* 1985; 34:799-804.
10. **Lukaszewski R, Brooks T.** Pegylated alpha interpheron is an effective treatment for virulent venezuelan equine encephalitis virus and has profound effects on the host response to infection. *J Virol*. 2000, 74: 5006-5015.
11. **Stites D, Terr A, Praslow T.** Inmunología Básica y Clínica. 8^{va} Edición: El Manual Moderno S.A. de C.V; 1996, p 133-155.
12. **Jones L, Bennett A, Moss S, Gould E, Phillpotts R.** Cytotoxic T-cell activity is not detectable in Venezuela equine encephalitis virus-infected mice. *Virus Research* 2003; 91:255-259.
13. **Lennette E.** General principles underlying laboratory diagnosis of viral and rickettsial infections. En: Lennette E and Schmidt N. *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. New York: American Public Health Association, Inc.; 1969. P 1-65.
14. **Sapan C, Lundblad R, Price N.** Review. Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnol Appl Biochem* 1999; 29:1-14
15. **Greider F, Davis B, Zhou X, Chen Sh, Finkelman F, Gause W.** Kinetics of cytokine expression and regulation of protection following infection with molecularly cloned Venezuelan equine encephalitis virus. *Virology* 1997; 233:302-312.
16. **Olsen A, Morrey JD, Smee DF, Sidwell RW.** Correlation between breakdown of the blood-brain barrier and disease outcome of viral encephalitis in mice. *Antiviral Research* 2007; Volumen, No..104-112.
17. **Paul S, Ricour C, Sommereyns C, Sorgeloos F, Michiels T.** Type I interferon

- response in the central nervous system. *Biochemie* 2007; 89:770-778.
18. **Hausmann J, Pagentecher A, Baur K, Richter K, Rziha HJ, Staeheli P.** CD8 T cells require gamma interferon to clear borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *J Virol* 2005; 79:13509-13518.
 19. **Parra B, Hinton D, Martin N, Bergmann C, Lin M, Yang C, Stohlman S.** IFN- γ is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia. *J Immunol* 1999; 162:1641-1647.
 20. **Rodríguez M, Zoeklein L, Howe C, Pavelko K, Gamez J, Nakane S, Papke L.** Gamma interferon is critical for neuronal viral clearance and protection in a susceptible mouse strain following early intracranial Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12252-12265.
 21. **Pan W, Zhang L, Liao J, Csernus B, Kastin A.** Selective increase in TNF α permeation across the blood-spinal cord barrier after SCI. *Journal of Neuroimmunology* 2003; 134:11-117.
 22. **Schoneboom B, Fultz M, Miller T, McKinney L, Greider F.** Astrocytes as targets for Venezuelan Equine Encephalitis virus infection. *J Neurovirol* 1999; 5:342-354.
 23. **Schoneboom B, Lee J, Greider F.** Early expression of IFN-alpha/beta and iNOS in the brain of Venezuelan equine encephalitis virus-infected mice. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20:205-215.
 24. **Huprikar J, Dal Canto MC, Rabinowitz SG.** Protection against lethal Venezuelan equine encephalitis (VEE) virus infection by cell-free supernatant obtained from immune spleen cells. *J Neurol Sci* 1990; 97:143-153.
 25. **Valero N, Bonilla E, Pons H, Chacín-Bonilla L, Añez F, Espina LM, Medina-Leendertz S, García-Tamayo J.** Melatonin induce changes to serum cytokines in mice infected with the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96:348-351.
 26. **Bonilla E, Valero N, Chacín-Bonilla L, Pons H, Larreal Y, Medina S, Espina L.** Melatonin increases interleukin-1 β and decreases Tumor Necrosis Factor alpha in the brain of the mice infected with Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Neurochem Res* 2003; 28:687-692.