

La suplementación con vitaminas antioxidantes a mujeres con endometriosis disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y aumenta la síntesis de IFN- γ en leucocitos periféricos en cultivo

CÉSAR HERNÁNDEZ-GUERRERO,^a SORAYA BURROLA-MÉNDEZ,^a MERCEDES GENERA-GARCÍA,^a JENNIFER MIER-CABRERA,^{a,d} PAUL OLIVER CRUZ-OROZCO,^b LUIS JIMÉNEZ-ZAMUDIO^c

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto de la suplementación con vitaminas C y E sobre la producción de citocinas proinflamatorias e IFN- γ .

Metodología: Participaron 34 mujeres de la Clínica de Esterilidad del Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" (INPerIER), con diagnóstico de endometriosis. El estudio fue de tipo clínico controlado aleatorizado doble ciego. Durante seis meses las pacientes recibieron una barra con vitaminas C y E (343 mg/84 mg) o un placebo. En la primera y última consulta, se tomó una muestra de sangre periférica que se estimuló durante 24 horas en presencia de lipopolisacárido. Al término, se recuperó el plasma para evaluar la producción de Interferón-gamma (IFN- γ), Interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α), mediante la técnica de ELISA.

Resultados: En el grupo de intervención la producción de IL-6 e IL-1 β disminuyó, mientras que el IFN- γ aumentó, después de seis meses de intervención (IC 95%). El grupo placebo no presentó cambio en el patrón de citocinas al final del estudio. La comparación entre grupos al final del estudio mostró una disminución en la producción de IL-6 e IL-1 β , asociado a un aumento de IFN- γ por parte del grupo que recibió la suplementación con vitaminas (IC 95%). No se encontró diferencia estadística alguna en cuanto a la producción de citocinas al inicio del estudio, en forma intergrupala. No se observaron diferencias inter o intragrupales en cuanto a la producción de TNF- α .

Conclusión: La suplementación con vitaminas C y E durante seis meses disminuyó la producción de IL-1 β e IL-6 y aumentó el IFN- γ en las mujeres estudiadas.

PALABRAS GUÍA: Vitamina C, vitamina E, ensayo clínico, suplementación, endometriosis, citocinas proinflamatorias, IFN- γ .

^a Departamento de Biología Celular.

^b Departamento de Obstetricia, Instituto Nacional de Perinatología, "Isidro Espinosa de los Reyes".

^c Dirección General, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.

^d Estudiante del Programa de Posgrado en Ciencias Quimiobiológicas de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, No. de registro: 3061020

Correspondencia:

Dr. César Hernández-Guerrero

Departamento de Biología Celular. Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes". 3er Piso Torre de Investigación. Montes Urales 800, Col. Lomas Virreyes, C.P. 11000, México D.F. Tel.: + 52 552-099-00, Fax: + 52 552 097-05.

Correo electrónico: biol.cel@servidor.inper.edu.mx

Recibido: 21 de agosto de 2007.

Aceptado: 30 de agosto de 2007.



INTRODUCCIÓN

La endometriosis se define como la presencia y crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina. Dicha patología representa una de las alteraciones ginecológicas benignas más comunes, la cual afecta aproximadamente a 5% de la población en general. Para el caso de las mujeres infértiles, la prevalencia reportada se encuentra entre 30-50%.^{1,2} Al igual que el tejido endometrial eutópico, los implantes ectópicos reaccionan a los cambios hormonales que controlan el ciclo menstrual, por lo que proliferan, se descaman y sangran sin que el tejido pueda ser expulsado del organismo. Dicho fenómeno es el responsable de la irritación local y de la activación de las células fagocíticas, lo que conduce a la aparición de un estado proinflamatorio capaz de promover la aparición de tejido fibrótico, cicatrices y adherencias.³

Al respecto, las evidencias han podido identificar que las mujeres con endometriosis presentan una mayor concentración de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6), tanto en la cavidad peritoneal como en el ámbito periférico, en comparación con mujeres sanas fértiles.⁴ El estado proinflamatorio es consecuencia de la activación local de células fagocíticas, que se presume reaccionan bajo el estímulo del tejido implantado en forma ectópica. Sumado al estímulo de las células y tejido endometrial, que arriba a dicha cavidad a través de las trompas, mediante el contraflujo menstrual. La activación de los macrófagos los conduce a un fenómeno denominado estallido respiratorio, en el cual se sintetizan y liberan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.⁵ De no existir una adecuada concentración y función de los mecanismos antioxidantes encargados de neutralizar las especies reactivas de oxígeno, se puede presentar el fenómeno denominado: estrés oxidativo. El cual se ha señalado está involucrado con el desarrollo de la endometriosis, así como en la esterilidad que presentan un alto porcentaje de las mujeres que la padecen.

En este sentido, una mayor presencia de los radicales libres capaces de conducir a un estado de estrés oxidativo, pueden inhibir o suprimir diversos mecanismos efectores y reguladores de la respuesta inmunológica celular o Th1. La cual se ha reportado abatida o disminuida en las mujeres con endometriosis, lo que se propone es un factor primordial en la supervivencia, establecimiento y desarrollo del tejido

endometrial en forma ectópica.^{6,7} Se ha demostrado que el óxido nítrico (ON), reduce la fosforilación y activación de las proteínas JAK3/STAT5, encargadas de la transducción de señales que coordinan la activación de los linfocitos T. Lo que inhibe la respuesta proliferativa de dichas células, bajo la acción de la IL-2. Asimismo, el ON es un potente inhibidor de la respuesta Th1, ya que abate la síntesis de IFN- γ en las células NK y linfocitos T cooperadores.⁶⁻⁹

En el año 2006,¹⁰ nuestro grupo de investigación reportó que las mujeres con endometriosis presentan un consumo deficiente de vitamina E y selenio, en comparación con mujeres sanas fértiles. Dicho hallazgo demostró que conforme aumentaba la severidad de la patología, disminuía el consumo de dichas moléculas antioxidantes. Además, dicha disminución se relacionaba con un aumento en marcadores de estrés oxidativo peritoneal y periférico. Por otro lado, Parazzini y cols,¹¹ sugieren que el riesgo de padecer endometriosis tiene relación con los hábitos alimenticios de las mujeres estudiadas. Parazzini reportó que el riesgo de padecer endometriosis disminuía significativamente cuando se consumían frutas y verduras, mientras que el riesgo aumentaba significativamente con el consumo de carnes rojas. Dicho reporte identificó, por vez primera, una relación entre la endometriosis y el consumo de frutas y verduras, alimentos que contienen moléculas antioxidantes.

A partir de las evidencias antes mencionadas, en el presente trabajo se evaluó el efecto de una suplementación combinada con vitamina C y E, en mujeres estériles con endometriosis durante seis meses, con la intención de observar modificaciones en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), así como en la citocina IFN- γ , relacionada con la respuesta Th1, mediante estudios de estimulación de sangre periférica completa en forma *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Ensayo clínico controlado aleatorizado, doble ciego, con diseño longitudinal.

Población de estudio

Mujeres estériles con endometriosis que acudieron a la Clínica de Esterilidad del Instituto Nacional de

Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes". Los criterios de inclusión fueron: edad entre 25-35 años, que vivieran en el Distrito Federal y área metropolitana, con diagnóstico de endometriosis mediante laparoscopia diagnóstica, factor de esterilidad masculina excluida y no haber consumido suplementos vitamínicos en el último año. Los criterios de eliminación fueron: la presencia de enfermedad pélvica inflamatoria, antecedentes de enfermedades autoinmunes y/o metabólicas, no querer participar en el estudio y faltar a dos consultas consecutivas. Todas las pacientes que decidieron participar firmaron una Carta de consentimiento informado. Los procedimientos propuestos en esta metodología cumplen con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki.

Muestras biológicas

La muestra de sangre periférica se tomó a partir de punción intravenosa del antebrazo en la primera y última consulta. Se utilizaron tubos con heparina como anticoagulante (*Becton Dickinson*, New Jersey, USA).

Ensayo clínico

La suplementación con vitaminas se llevó a cabo mediante la administración de barras que contenían 343 mg de vitamina C y 84 mg de vitamina E (HeartBar, CooPharma, USA). El grupo control recibió las barras placebo, compuesta por los mismos ingredientes que la barra de intervención, excepto por las vitaminas. Las barras fueron producidas y empacadas en envolturas metalizadas blancas opacas. Las barras fueron asignadas por un investigador ajeno al estudio como barra "A" y barra "B". La distribución aleatoria de las pacientes se realizó en la primera consulta, mediante la extracción de una bola roja (Grupo A) o negra (Grupo B). Los códigos se abrieron al final del estudio para conocer el grupo que consumió el placebo o la barra con vitaminas.

El día posterior a la cirugía a cada participante se le comentó con detalle en qué consistía el estudio, los beneficios posibles del mismo y se programó la primera consulta. Se les pidió a las participantes que consumieran una barra diaria en cualquier momento del día, y en caso de omisión, no deberían comer dos barras al siguiente día. Asimismo, se les informó sobre la importancia de no calentarlas. En un documento específico, se registraron el consumo diario

de la barra y cualquier malestar que ésta les ocasionó. Al término de 31 días, deberían asistir a la siguiente consulta, entregar dicho registro con las anotaciones, así como las envolturas de las barras consumidas y las no consumidas para evaluar el apego a las mismas. En esta consulta se les entregarían las siguientes 31 barras, el documento para el registro del mes siguiente y así sucesivamente por un período de seis meses.

Estimulación de sangre periférica con lipopolisacárido

La sangre periférica de cada paciente se diluyó 1:4. Con medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina 25 mM HEPES, sin bicarbonato de sodio, adicionado con penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100 ug/mL (GIBCO, USA) y con medio de cultivo que tenía una concentración de 6 mg/mL de lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, cepa O26:B6 (Sigma, USA).

La sangre diluida con el medio, se colocó por cuadruplicado en una placa de 24 pozos de fondo plano (Costar, USA) marcada con la leyenda S/E (sin estímulo) y LPS, para incubarse durante 24 horas a 37 °C. El periodo entre la recolección de la sangre y el inicio de la incubación fue menor de una hora. A las 24 horas se retiró la sangre de los pozos y se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C, en una centrífuga refrigerada Labofuge 400 R (*Heraeus, Hanau*, Alemania). El sobrenadante se guardó en tubos de 1.5 mL etiquetados a -70 °C, hasta la cuantificación de las citocinas.

Cuantificación de citocinas mediante la técnica de ELISA

La determinación de la concentración de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , se llevó a cabo mediante un ensayo de ELISA tipo "sandwich", desarrollado en el laboratorio con reactivos comerciales (anticuerpos y estándar de citocinas de la marca *Pharmingen*, USA). Todos los reactivos químicos empleados fueron de la marca *Sigma*, USA. La metodología empleada se describe a continuación. Se colocaron 50 uL por pozo del anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/mL en solución de unión (Na_2HPO_4 0.1 M, ajustando el pH a 9.0 con NaH_2PO_4 0.1 M). Las placas se dejaron incubando a 4 °C toda la noche. Se retiró la solución de unión y se lavó cada placa con PBS/Tween (0.5 mL de Tween-20, en un litro de PBS). El bloqueo de las uniones inespecíficas se realizó con



200 mL por pozo de amortiguador de bloqueo (AB) (Albúmina sérica bovina al 1% en PBS) y se incubó durante dos horas y media. Posteriormente, se colocaron 100 μ L por pozo de estándares, controles y muestras. Las placas se incubaron a 4 °C toda la noche. Se colocaron 100 μ L por pozo del anticuerpo de detección conjugado con biotina a una concentración de 2 μ g de proteína/mL de solución. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y se agregaron 100 mL por pozo del conjugado de estreptavidina/fosfatasa alcalina, dilución 1:10000, mismo que se dejó incubar a 37 °C, durante una hora. El desarrollo de color se hizo mediante la utilización del cromógeno para-nitrofenilfosfato, determinando la absorbancia de las muestras y curva estándar en un colorímetro (*Ortho Clinical Diagnostic, Johnson&Johnson, USA*) a 405 nm el filtro de medición y 620 nm, el filtro de referencia.

La concentración de las citocinas en las muestras problema se determinó mediante la interpolación de la absorbancia obtenida de la muestra en la curva de calibración de absorbancia, *versus* concentración de la citocina estándar. Las variaciones intra e interensayo provenientes de las concentraciones de los estándares y muestras testigo, estuvo en ambos casos por debajo de 10%.

Análisis estadístico

Las concentraciones de citocinas se describen mediante medidas de tendencia central. Para el análisis pre y posintervención, se utilizó la prueba de T-Student. En todos los casos se consideró una diferencia significativa con un $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa de cómputo *Sigma Stat 3.11 (Systat Software Inc. USA)*.

RESULTADOS

Al término del estudio, 34 pacientes participaron en el protocolo de suplementación con vitaminas. Una vez transcurridos los seis meses de intervención, los códigos de las barras se dieron a conocer, para así poder analizar los datos. La barra placebo fue administrada al Grupo A ($n = 18$) y la barra con vitaminas al Grupo B ($n = 16$).

El grupo de mujeres que recibieron el placebo (Grupo A), estuvo conformado por 10/18 (61%) participantes con endometriosis grado I; 8/18 (39%)

con endometriosis grado II, con una edad promedio de 32.8 ± 2.5 años, que presentaron un apego a la intervención de $89.9\% \pm 1.7$. Para el caso del grupo de mujeres que recibieron el suplemento vitamínico (Grupo B), éste se conformó por 9/16 (56%) participantes con endometriosis grado I; 7/16 (44%) con endometriosis grado II, con una edad promedio de 32.7 ± 2.3 años y presentaron un apego a la intervención de $87.6\% \pm 1.8$. Las mujeres de ambos grupos presentaban un diagnóstico de esterilidad de más de cinco años y residían en el área metropolitana. No se observó diferencia estadísticamente significativa alguna, en las variables antes descritas entre ambos grupos. Ninguna de las pacientes recibió tratamiento hormonal, antes o después de la cirugía, ni durante la intervención con vitaminas.

Todas las pacientes contaron con buena salud a lo largo de los seis meses de intervención. Ninguna paciente reportó algún malestar o efecto adverso por el consumo de las barras, únicamente la desaparición del estreñimiento. Las pacientes informaron que las barras tenían buen sabor, consistencia agradable, aunque un poco dulces, por lo cual fue posible su consumo en una sola toma. Unas pocas comentaron que dividían en porciones la barra y la consumían en varias tomas al día. La suplementación realizada con las barras (343 mg de vitamina C y 84 mg de vitamina E) representó 4.57 y 6.56 veces, respectivamente; esto es, la ingesta diaria recomendada para mujeres mexicanas.

Producción de citocinas

En el grupo de mujeres que recibió la suplementación con vitaminas (Grupo B), la concentración de IL-6 e IL-1 β disminuyó significativamente, mientras que el IFN- γ aumentó al final de la intervención. No se encontró diferencia en la concentración de TNF- α , antes o después del tratamiento. En las mujeres que consumieron el placebo (Grupo A) no hubo cambios en el patrón de citocinas evaluadas, antes o después de seis meses (Figura 1).

Al comparar la producción de citocinas entre el grupo control y el grupo de intervención al final del estudio, se observó una disminución significativa en la producción de IL-6 e IL-1 β y un aumento en el IFN- γ por parte del grupo que recibió las vitaminas. No se encontró diferencia significativa en los valores de las citocinas al inicio del estudio (Figura 2).

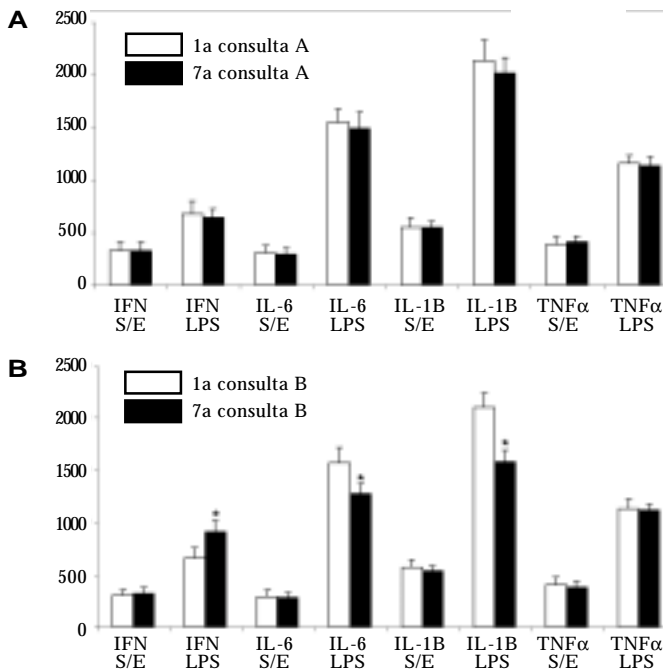


Figura 1

Producción de citocinas obtenida por leucocitos en cultivo en la primera (□) y séptima consulta (■) del grupo que consumió la barra placebo (panel A) y con vitaminas antioxidantes (panel B). Valores promedio \pm desviación estándar.

***p < 0.001, prueba T-Student.
S/E: Sin estímulo.**

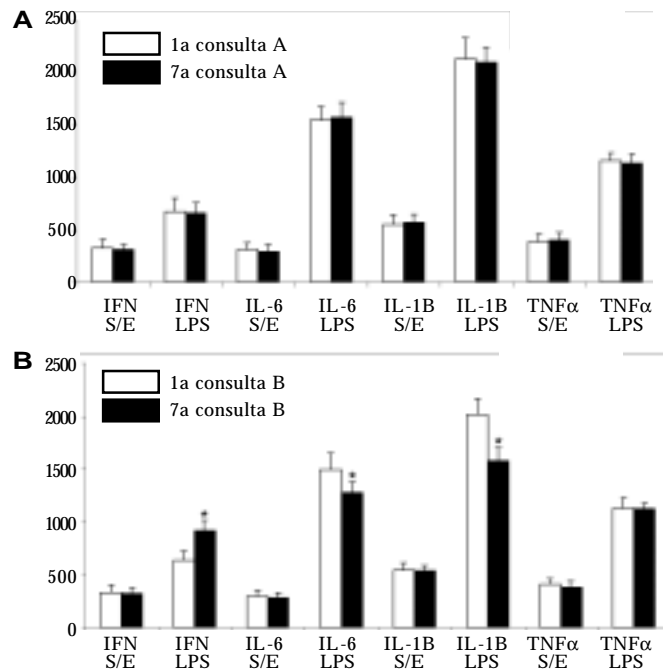


Figura 2

Producción de citocinas obtenida por leucocitos en cultivo del grupo que consumió la barra placebo (□) y con vitaminas antioxidantes (■) en la primera (panel A) y séptima consulta (panel B). Valores promedio \pm desviación estándar.

***p < 0.001; Prueba T-Student.
S/E: Sin estímulo.**

DISCUSIÓN

A pesar de que se tiene conocimiento de la endometriosis desde hace muchos años, sigue siendo una afección ginecológica benigna multifactorial, donde aún no se tiene una integración de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad. Uno de los fenómenos señalados ha sido el abatimiento o disminución de la respuesta inmunológica celular o Th1 en las mujeres que presentan la patología.^{4,6} Dichas alteraciones inmunológicas se asocian con una deficiente capacidad para evitar la implantación y desarrollo en forma ectópica del tejido endometrial; sin embargo, se desconocen las causas que condicionan dicha alteración.⁵ Una explicación que al respecto proponemos, tiene relación con el estado proinflamatorio y el estrés oxidativo que presenta este grupo de mujeres, asociado con el deficiente consumo de moléculas antioxidantes que nuestro grupo de trabajo ha señalado.^{10,11}

Los resultados obtenidos mediante la suplementación con las vitaminas antioxidantes a las mujeres del grupo de estudio, mostraron un aumento en la producción de IFN- γ , asociado con una disminución de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-6, en comparación con los valores observados en las mujeres del grupo testigo. Este hallazgo guarda relación con las evidencias que han señalado al estado redox-intracelular, como participante en la regulación de diversos aspectos de la función celular. Se ha visto que la modulación de las vías de transducción de las señales intracelulares, ocurre cuando las células son expuestas a especies reactivas de oxígeno, como el peróxido de hidrógeno y el superóxido.¹² Por un lado, el estrés oxidativo activa el factor de transcripción NF-kB, importante molécula que enciende la transcripción de genes de citocinas proinflamatorias. Mientras que antioxidantes como la vitamina C, ejerce funciones inhibitorias de cinasas, lo que suprime la actividad del IKK α e IKK β , moléculas involucradas



en la activación del factor transcripcional NF- κ B, antes señalado.^{13,14}

Asimismo, el efecto propuesto de la vitamina C sobre la disminución de las citocinas proinflamatorias, pensamos que tuvo un efecto sinérgico a través de la vitamina E. Ya que dicha vitamina, por un lado ejerce función antioxidante en el ambiente lipofílico, lo que otorga protección de los lípidos de las membranas celulares del ataque de los radicales libres; mientras que dentro de sus funciones no antioxidantes, participa en la regulación génica implicada en la disminución de expresión de genes relacionados con la inflamación.¹⁵ Este mecanismo se ha descrito que aparece mediante la inhibición del estallido respiratorio y la generación del radical superóxido en monocitos y polimorfonucleares, a través de la inhibición de la proteína cinasa C (PKC), seguido de la atenuación de la fosforilación de p47 (phox) y su traslocación a la membrana.¹⁶ Beharka y cols, reportaron mediante la suplementación con vitamina E en un modelo murino, una disminución de la producción de ON, por parte de macrófagos peritoneales estimulados con LPS.^{17,18} Devaraj y cols. al suplementar a voluntarios sanos con 1200 UI de vitamina E (800 mg α -tocoferol) durante ocho semanas, observaron al término del estudio una disminución de la liberación de superóxido, de marcadores de lipoperoxidación, de adhesión al endotelio y de la secreción de IL-1 β por parte de macrófagos en cultivo. Este último fenómeno, se identificó como consecuencia de la inhibición ocurrida a la enzima 5-lipooxigenasa.^{19,20}

Por otro lado, el aumento observado de IFN- γ en el modelo empleado en nuestro estudio, tiene relación con el estado redox-celular y la dirección de la respuesta inmunológica hacia el brazo Th1. Malmberg suplementó, durante dos semanas con 750 mg de α -tocoferol a pacientes con cáncer de colon avanzado, e identificó que al término de la intervención mejoró la capacidad de los linfocitos T para producir IFN- γ e IL-2.²¹ Murata y cols., en el año 2002, demostraron que la polarización hacia el brazo Th1 es dependiente del estado intracelular de glutatión de las células presentadoras de antígeno (CPA; macrófagos, células dendríticas y linfocitos B). Las CPA deben estar en un estado elevado de reducción intracelular, en forma previa a la presentación de

antígeno, para poder dirigir la respuesta inmunológica hacia el brazo Th1. La pérdida de glutatión intracelular en macrófagos disminuye la producción de IL-12, citocina indispensable para la activación de linfocitos T y NK, encargadas de sintetizar IFN- γ y promover una respuesta celular. Al encontrarse las CPA en un estado elevado de reducción y ser activadas, inician o aumentan la síntesis de IL-12 y disminuyen la producción de IL-6.²²

Meister, empleando el modelo animal de cobayo, el cual es incapaz de sintetizar ascorbato, demostró la interacción existente entre el glutatión y la vitamina C, al identificar que el ascorbato ayudaba a animales deficientes de glutatión a regenerar a los radicales tiol a glutatión.^{23,24} La asociación entre la vitamina C y el glutatión se puede atribuir a sus funciones antioxidantes. Ambos son blancos de los radicales libres debido a su elevada concentración dentro de las células, por lo que al competir ambas moléculas por los radicales libres, el incremento en el consumo de vitamina C previene la oxidación del glutatión.

Por otro lado, diversos efectos fisiológicos y patológicos se han atribuido a la IL-1 β relacionados con el desarrollo de la endometriosis. En la cavidad peritoneal dicha citocina induce la producción de prostaglandinas, la proliferación de fibroblastos, el depósito de colágena y la formación de fibrinógeno. Asimismo, la IL-1 β induce la síntesis de IL-6 por parte de los macrófagos; citocina última que presenta efecto sobre la proliferación del tejido endometrial y de angiogénesis.²⁵ Mecanismos capaces de contribuir con la fibrosis y formación de adhesiones relacionadas con la patología. De aquí que la disminución en la secreción de las citocinas proinflamatorias, asociado con el aumento de IFN- γ , pueda tener un efecto positivo sobre el desarrollo de la enfermedad, los síntomas y/o la condición de esterilidad observada en este grupo de mujeres; aunque será necesario realizar nuevos estudios dirigidos al respecto, para evaluar los objetivos antes mencionados.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto: Respuesta inmunológica peritoneal y antioxidantes en mujeres estériles con endometriosis. Fondo SALUD-2002-C-01-7615/A-1, México.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the vitamins C and E supplementation on the production of cytokines inflammatory mediators and IFN- γ .

Method: 34 women with endometriosis diagnosis participated of the Clinic of Sterility at the Instituto Nacional de Perinatología, Isidro Espinosa de los Reyes (INPerIER). The study was a controlled randomized and double blind clinical trial. During six months the patients received a bar with vitamins C and E (343 mg/84 mg) or placebo. In the first and last consultation, a blood sample stimulated during 24 hours was taking with lipo-polysacarid presence. At the term, we recovered the plasm to evaluate the production of Interferon-gamma (IFN- γ), Interleukyn-1 beta (IL-1 β), IL-6 and Tumoral Necrosis Factor-alpha (TNF- α), by ELISA technique.

Results: In the intervention group the production of IL-6 and IL-1 β diminished, while the IFN- γ increased, after six months of intervention (CI 95%). The placebo group didn't present change in the cytokines pattern at the end of the study. The comparison among groups at the end of study showed a decrease in the production of IL-6 and IL-1 β , associated to an increase of IFN- γ , on the group that received the vitamins supplementary (CI 95%). There was not statistical difference between the cytokines production from the beginning of study, for inter groups. There was not differences observed inter or intra groups for the TNF- α production.

Conclusion: After six months, the vitamins C and E supplementation diminished the IL-1 β production and IL-6 and increased the IFN- γ production in the women of the study.

KEY WORDS: *Vitamin C, vitamin E, clinical trial, supplementation, endometriosis, cytokines inflammatory mediators, and IFN- γ .*

REFERENCIAS

1. Cramer DW, Missmer SA. The epidemiology of endometriosis. *Ann NY Acad Sci* 2002; 955: 11-22.
2. Preciado RR, Torres CJ, Zúñiga MJA, Martínez CJC, Manterola AD, García LA. Incidencia de la endometriosis en mujeres con infertilidad: características clínicas y laparoscópicas. *Ginecol Obstet Mex* 2005; 73: 471-6.
3. Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24: 219-33.
4. Kyama CM, Overbergh L, Debrock S, Valckx D, Vander PS, Meuleman C, et al. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 85: 1667-75.
5. Kyama CM, Debrock S, Mwenda JM, D'Hooghe TM. Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:123.
6. Hernández-Guerrero CA, Tlapanco-Barba R, Ramos-Pérez C, Velásquez-Ramírez N, Castro-Eguiluz D, Cébulo-Vázquez A. Endometriosis y abatimiento de las características de la respuesta inmunológica citotóxica. *Ginecol Obstet Mex* 2003; 71: 559-74.



7. Hernández-Guerrero C, Vadillo-Ortega F, Beltrán-Montoya J, Farina-Granja M, Ávila-Vergara MA, Bustos-López H, Arriaga-Pizarro L. Inducción de la síntesis de óxido nítrico en células mononucleares en cultivo utilizando líquido peritoneal de mujeres con endometriosis, en relación al porcentaje de linfocitos T y células NK identificando en dicho ambiente. *Ginecol Obstet Mex* 2001; 69: 12-18.
8. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR. Macrophage-derived nitric oxide regulates T-cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* 1998; 160: 5729-34.
9. Van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1491-5000.
10. Hernández-Guerrero CA, Bujalil-Montenegro L, De la Jara-Díaz J, Mier-Cabrera J, Bouchan-Valencia P. Endometriosis and deficient intake of antioxidant molecules related to peripheral and peritoneal oxidative stress. *Ginecol Obstet Mex* 2006; 74: 20-8.
11. Parazzini F, Chiaffarino F, Surace M, Chatenoud L, Cipriani S, Chiantera V, et al. Selected food intake and risk of endometriosis. *Hum Reprod* 2004; 19: 1755-9.
12. King MR, Ismail AS, Davis LS, Karp DR. Oxidative Stress Promotes Polarization of Human T cell Differentiation toward a T Helper 2 Phenotype. *J Immunol* 2006; 176: 2765-72.
13. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signalling. *J Clin Invest* 2003; 111: 769-78.
14. Cárcamo JM, Pedraza A, Bórquez-Ojeda O, Zhang B, Sánchez R, Golde DW. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I κ B α kinase. *Mol Cell Biol* 2004; 24(15): 6645-52.
15. Azzi A, Gysin R, Kempná P, Munteanu A, Villacorta L, Visarius T, et al. Regulation of gene expression by α -tocopherol. *Biol Chem* 2004; 385: 585-91.
16. Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gouregot-Pocidal MA, Leger CL. Alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem* 1998; 273: 32801-5.
17. Beharka AA, Han SN, Adolfsson O, Wu D, Smith D, Lipman R, et al. Long term dietary antioxidant supplementation reduces production of selected inflammatory mediators by murine macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19: 646-55.
18. Beharka AA, Wu D, Han SN, Meydani SN. Macrophages PGE2 production contributes to the age-associated decrease in T cell function which is reversed by dietary antioxidants. *Mech Ageing Dev* 1997; 93: 59-77.
19. Devaraj S, Li D, Jialal I. The effects of alpha-tocopherol supplementation on monocyte function decreased lipid oxidation, interleukin 1 β secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest* 1996; 98: 756-63.
20. Devaraj S, Jialal I. α -tocopherol decreases interleukin-1 β release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1125-33.
21. Malmberg J, Lenei R, Petersson M, Ohlum T, Ichihara F, Glimelius B, et al. A short-term dietary supplementation of high doses of vitamin E increases T helper 1 cytokine production in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Can Res* 2002; 8: 1772-78.
22. Murata Y, Shimamura T, Mauro J. The polarization of Th1/Th2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 2002; 14: 201-12.
23. Meister A. Glutathione ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994; 269: 9397-400.
24. Meister A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1271:35-42.
25. Gazvani R, Templeton A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reprod* 2002; 123: 217-26.