

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Evaluación de las Propiedades Inmunomoduladoras de la Vitamina E en Pacientes con
Tuberculosis.

POR:

ANDRÉS MENDOZA MENDOZA

POR:

ANDRÉS MENDOZA MENDOZA

TESIS APROBADA POR LA

COMISIÓN DE EXAMINADORES DE LA ESCUELA DE POSGRADO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

C.I.A.D., A.C.
RECEBIDA
N 3 1111 1111
BIBLIOTECA
111 001
1111 1111 1111

HERMOSILLO, SONORA.

FEBRERO DEL 2005

**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo A.C.**

Evaluación de las Propiedades Inmunomoduladoras de
la Vitamina E en Pacientes con Tuberculosis.

FOI:

ANDRÉS MENDOZA MENDOZA

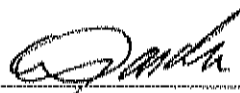
Tesis aprobada por la
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

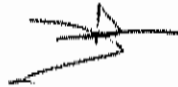
La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director de tesis.



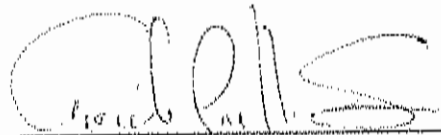
Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Andrés Mendoza Mendoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Jesús Hernández López
Director de Tesis



Dra. Araceli Pinelli Saavedra



Dra. Eyeria Acedo Félix



Dra. Adriana Garibay Escobar

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández.

Este trabajo fue financiado por los Fondos Mixtos Sonora CONACYT, proyecto No. SON-2004-C01-025

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del Programa Estatal para el Control de la Tuberculosis de la Secretaría de Salud del Estado de Sonora.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Sonora (ISSSTESON) por otorgar la beca para la realización de este proyecto.

A las autoridades de Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Por abrirme las puertas de esta gran Institución y aceptarme en el programa de maestría.

A mi Comité de tesis, Dr. Jesús Hernández López, Dra. Araceli Pinelli Saavedra, Dra. Evelia Acedo Félix y Dra. Adriana Garibay, les agradezco su paciencia y apoyo.

A todos y cada uno de los profesores que amablemente compartieron sus conocimientos y experiencias.

A todo el personal del Departamento de Nutrición, gracias por su entusiasmo y apoyo. Al Dr. Mauro Valencia J. por todas su atenciones y apoyo.

Al Q.B. Francisco Vázquez, agradezco su amistad y asesoría en el uso del HPLC.

A todo el personal técnico y administrativo, especialmente al personal de biblioteca.

A mis compañeros estudiantes por su grata amistad.

DEDICATORIA

A mi familia, que siempre ha sido la motivación más importante: a mi esposa Isabel, mis hijos, José Antonio y Jorge Andrés y a sus novias Mary y Brenda.

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	vii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	3
General	3
Específicos	3
ANTECEDENTES	4
Respuesta inmune a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
Polarización de la respuesta a <i>M. tuberculosis</i>	6
Vitamina E	8
Propiedades antioxi-dantes	8
Propiedades inmunomoduladoras	9
Mecanismo de acción	11
SUJETOS Y MÉTODOS	12
Sujetos de Estudio.....	12
Tamaño de muestra	12

Criterios de inclusión	12
Criterios de exclusión.....	13
Criterios de eliminación.....	13
Diseño del Estudio	13
Variables de respuesta	14
Análisis estadístico	14
Técnicas de Laboratorio	15
Preparación de vitamina E	15
Separación de células mononucleares (CMN).....	15
Incorporación de vitamina E a CMN	16
Ensayo de proliferación	16
Determinación de vitamina E en CMN por HPLC	16
Condiciones de HPLC.....	17
Producción de interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2).....	17
RESULTADOS	19
Sujetos de Estudio	19
Curva de Estimulación	19
Proliferación de CMN	20
Incorporación de Vitamina E	24
Determinación de Citocinas Intracelulares	26
Interferón- γ (IFN- γ).....	26

Interleucina-2 (IL-2).....	26
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
REFERENCIAS	36

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Proliferación de células mononucleares	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Curva de proliferación con diferentes concentraciones de antígeno de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
2. Proliferación de CMN de sujetos saludables PPD+ y enfermos.....	23
3. Incorporación de vitamina E en CMN de sujeto saludable.....	25
4. Incorporación de vitamina E en CMN de enfermos y sujetos saludables PPD+.....	25
5. Producción de IFN- γ de CMN de enfermos y sujetos saludables PPD+....	27
6. Producción de IL-2 de CMN de enfermos y sujetos saludables PPD+....	29

RESUMEN

Los enfermos con tuberculosis presentan baja producción de citocinas Th1. Para controlar la infección, es necesario corregir la producción de IFN- γ e IL-2. La vitamina E posee propiedades inmunomoduladoras que inducen la producción de citocinas Th1 en ciertas poblaciones. Por lo tanto, evaluamos estas propiedades en pacientes con tuberculosis, con la hipótesis de que la suplementación de células mononucleares (CMN) aumentaría la producción de IFN- γ e IL-2. Se suplementó in vitro CMN de 17 enfermos y 11 sujetos saludables PPD+ con vitamina E (50 μ M) y se estimularon con PHA o PPD. Se determinó la incorporación de vitamina E por HPLC, la capacidad proliferativa por incorporación de timidina marcada y la producción de IFN- γ e IL-2 por citometría de flujo. Los resultados muestran una tendencia a mayor proliferación en presencia de vitamina E, sin embargo no hubo diferencia entre el estímulo con antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* y la suplementación con vitamina E. La concentración de tocoferol aumentó en enfermos y sanos, sin diferencia significativa ($p > 0.05$). Los porcentajes de CMN productoras de IFN- γ e IL-2 es similar en ambos grupos ($p > 0.05$). Los resultados sugieren que la vitamina E incrementa la proliferación, pero no modifica la producción de citocinas Th1 en tuberculosis. Estos resultados deberán tomarse con cautela, debido al número de pacientes analizados. Además será necesario cuantificar IFN- γ en el sobrenadante de las CMN y los transcritos para esta citocina para conclusiones finales.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis continúa representando un problema de salud pública mundial a pesar de los grandes avances científicos y tecnológicos de la actualidad. Cada año se registran entre 8 y 12 millones de casos nuevos, y fallecen alrededor de tres millones de personas por esa causa. La Organización Mundial para la Salud (OMS), estima que un tercio de la población global está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (OMS, 1993) y es probable que esta enfermedad permanezca como una de las diez primeras causas de muerte en las próximas dos décadas (Anderson, 1998).

Nuestro país no es ajeno a este problema, algunos estados como Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Veracruz registran las prevalencias más altas. En el estado de Sonora, se registran alrededor de 500 casos nuevos cada año, con una tasa de mortalidad de 4.6 por cada 100,000 habitantes y no hay indicios de que esta situación mejore.

Para controlar el padecimiento, es necesario aplicar estrategias dirigidas a interrumpir la cadena de transmisión, a través de la curación y el control del enfermo. Ello implica la búsqueda y el tratamiento de los casos activos. Con esta medida se estima que se podrían evitar la aparición de 23 millones de casos nuevos en el mundo, durante el período comprendido entre 1998 y 2030 (Murray y Salomon, 1998).

Además de la aplicación de medidas epidemiológicas, es imprescindible la investigación básica dirigida al desarrollo de vacunas y medicamentos antituberculosos, más eficientes y accesibles, que prevengan la enfermedad o simplifiquen el tratamiento (Horwitz y Col., 1995; American Thoracic Society, 2003).

Para mejorar los resultados durante el tratamiento se han propuesto diversas intervenciones. Un enfoque atractivo es mejorar la respuesta inmune

con el empleo de inmunomoduladores e inmunoterapia (Zhang y Col., 1995; Karyadi y Col., 2002). En este sentido, existen reportes que sugieren propiedades inmunomoduladoras de la vitamina E, como el incremento en la producción de interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), que podrían ser útiles para mejorar la respuesta inmune de los pacientes con tuberculosis.

De acuerdo con lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar las propiedades *in vitro* de la vitamina E, en pacientes con tuberculosis activa.

OBJETIVOS

General

Evaluar, *in vitro*, el efecto inmunomodulador de la vitamina E sobre la producción de citocinas Th1 en células mononucleares (CMN) de pacientes con tuberculosis activa y controles saludables, con intradermoreacción positiva al derivado proteínico purificado (PPD+).

Específicos

- Analizar la respuesta de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) de CMN de enfermos con tuberculosis y sujetos saludables PPD+, suplementadas con vitamina E y estimuladas con antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* o fitohemaglutinina (PHA).
- Evaluar la respuesta proliferativa de linfocitos en las condiciones previamente citadas.
- Cuantificar la incorporación de vitamina E de CMN.

ANTECEDENTES

Respuesta Inmune a *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una enfermedad causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). El bacilo mide entre 2 y 4 μM de largo, es inmóvil y contiene abundantes lípidos complejos, ceras, fosfátidos, polisacáridos y proteínas que forman tres capas que envuelven la membrana plasmática (Burdon y Williams, 1982).

La ruta de entrada de *M. tuberculosis* al tracto respiratorio, es a través de la inhalación de bacilos expulsados durante la tos o estornudos de los individuos con tuberculosis. Una vez que alcanza la superficie alveolar del huésped, se inicia la respuesta para controlar la infección. Las células involucradas en limitar y eliminar al bacilo, son los macrófagos alveolares, que fagocitan a la micobacteria y a su vez producen citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 1 (IL-1), que favorecen el reclutamiento de otros macrófagos en el sitio de la infección para ampliar la respuesta (Schluger y Room, 1998). Se ha hipotetizado que a partir de este aumento en la respuesta, por medio de alguna de cuatro posibilidades: b) la multiplicación de la micobacteria con manifestaciones clínicas, conocida como tuberculosis primaria; c) la permanencia de la micobacteria en estado latente, sin causar enfermedad clínica, lo cual se manifiesta porque la prueba intradérmica a PPD es positiva; y d) los bacilos que han permanecido latentes, durante tiempo prolongado, vuelven a multiplicarse causando enfermedad clínica conocida como tuberculosis de reactivación (Schluger y Room, 1998).

La fagocitosis se inicia cuando los macrófagos identifican al bacilo por medio de receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4) y receptores de manosa. Estos últimos, reconocen a la glicoproteína lipoarabinomano (LAM),

que es un constituyente de la pared celular de la micobacteria. Se supone que el reconocimiento a través de estos receptores, confiere ventajas para la supervivencia del bacilo. Se ha demostrado *in vitro* que en monocitos, la LAM induce la producción del factor transformante del crecimiento-beta (TGF- β) y disminuye la producción de IL-1 y TNF- α , facilitando la supervivencia del bacilo (Fietta y Col., 2000).

Una vez fagocitada, la bacteria se expone a diferentes mecanismos encaminados a su destrucción, como los intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, particularmente el óxido nítrico. Sin embargo, la bacteria puede evadir estos mecanismos produciendo amoníaco, que inhibe la fusión del fagosoma con el lisosoma y alcaliniza el contenido intralisosomal (Schluger y Room, 1998). También produce catalasas que inactivan a los intermediarios reactivos del oxígeno (Wayne, 1994).

Posterior a la destrucción de la bacteria, se inicia la respuesta específica. Los macrófagos y las células dendríticas (CD) actúan como células presentadoras de antígenos y estimulan la respuesta de linfocitos T CD4+. Las CD que se encuentran en sitios de la infección inician la respuesta inflamatoria y se sabe que tienen capacidad de producir IFN- γ en respuesta a IL-12 (Giacomini y Col., 2001). Estudios recientes apoyan la hipótesis que las CD refuerzan la respuesta inmune celular contra la infección por *M. tuberculosis*, debido a que son productoras de IL-12 e IFN- γ (Jiao y Col., 2002).

La respuesta inmune adaptativa se da con la participación de los linfocitos CD4+. Estas células expresan receptores (TCR α/β) que reconocen antígenos micobacterianos de origen proteico, que han sido procesados y presentados como péptidos antigénicos asociados al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II). La participación de estas células es fundamental, ya que se encargan de producir citocinas que determinarán el tipo de respuesta protectora Th1 del paciente. La producción de estas citocinas

estará en función de los antígenos de la micobacteria y del microambiente (Horwitz y Col., 1995).

Los linfocitos CD8+, reconocen antígenos bacterianos que escapan del complejo fago-lisosoma y son procesados en el citosol y presentados en el contexto del MHC-I. Los antígenos micobacterianos de origen lipídico son presentados por moléculas CD1 y reconocidos por linfocitos T, que expresan receptores TCR γ/δ . Las células TCR γ/δ pueden tener un papel en la respuesta inmune temprana contra *M. tuberculosis*, y ser una parte importante en el establecimiento de la respuesta inmune protectora en aquellos pacientes con infección latente (Schluger y Room, 1998).

Es importante considerar que alrededor del 95% de las personas que tienen contacto con el bacilo no desarrollan enfermedad clínica, ya que presentan una respuesta inmune eficiente. Únicamente el 5% desarrolla el padecimiento (Van Crevel y Col., 2002). Sin embargo, las personas que tienen PPD+, tienen el riesgo de reactivación de la enfermedad si se presentan condiciones que comprometan su sistema inmune, como es el caso del uso de esteroides, medicamentos inmunosupresores o enfermedades como la diabetes o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Espinal y Col., 2001). Cuando se logren identificar con precisión estas diferencias se podrán diseñar estrategias encaminadas a la solución de este problema.

Polarización de la respuesta inmune a *M. tuberculosis*

Como se mencionó previamente, las células que participan en la respuesta inmune contra el bacilo de la tuberculosis, son los macrófagos y los linfocitos CD4 y CD8. Los linfocitos CD4 se clasifican en dos tipos de acuerdo al patrón de citocinas que producen: los Th1 y Th2. El fenotipo Th1 produce IFN- γ e IL-2, en tanto que el Th2 produce IL-4, IL-5 e IL-10. Para controlar el

bacilo es necesaria una respuesta de tipo Th1 para activar macrófagos e inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis*.

Varios autores han estudiado y confirmado que los enfermos de tuberculosis tienen disminuida la producción de citocinas de tipo Th1, cuando son comparados con sujetos sanos PPD+ (Zhang y Col., 1995; Torres y Col., 1997; Schwander y Col., 2000) y que la producción de IFN- γ se recupera después del tratamiento antibuerculoso exitoso (Hirsch y Col., 1999). Sin embargo, no explican los mecanismos por los cuales se presenta este efecto.

Una posible explicación a la polarización de la respuesta hacia el tipo Th2, es la producción sostenida de IL-4 (Rook y Col., 2004). Bhattacharyya y Col., (1999) y Perdow y Col., (2002) sugieren que la infección de las células dendríticas con *M. tuberculosis*, dirige a los linfocitos Th0 a diferenciarse en Th1 por producción de IL-12. Dichos autores también demostraron que el bacilo tiene la capacidad de suprimir la producción de IL-12.

Otra hipótesis planteada por Rook y Col., (2004), es que los enfermos presentan mecanismos reguladores que disminuyen la respuesta protectora. En este sentido, proponen que la respuesta Th1 falla, debido a una pequeña respuesta Th2 por IL-4, parcialmente opuesta por su antagonista IL-4 δ 2. La IL4 regula negativamente la respuesta Th1 y se encuentra elevada en los enfermos.

Debido a que la principal característica de los enfermos de tuberculosis es la producción insuficiente de citocinas de tipo Th1, se ha intentado corregir este defecto suministrando IFN- γ recombinante a personas con tuberculosis multifarmacorresistente (Condos y Col., 1999) y a personas infectadas con *Mycobacterium avium*, con resultados alentadores (Holland y Col., 1994). Estos enfermos mostraron mejoría de los síntomas, en los signos radiográficos y disminución o negatividad de bacilos en la expectoración. Sin embargo, la mejoría no se mantuvo al suspender el tratamiento.

Lo anterior pone de manifiesto el papel clave que tiene el IFN- γ en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* y abre la posibilidad de buscar alternativas para modular la respuesta dirigida a incrementar su producción endógena.

Para el tratamiento de pacientes con tuberculosis emerge un tópico de gran interés, la utilización de vitamina E. Estudios previos documentan que el empleo de esta vitamina liposoluble en poblaciones específicas como en el caso de adultos mayores, suplementados con diferentes dosis mejoran la respuesta inmune (Meydani y Col., 1997, 1999). También se ha probado en modelos animales infectados con virus de la influenza, con resultados alentadores (Han y Meydani, 2000).

Vitamina E

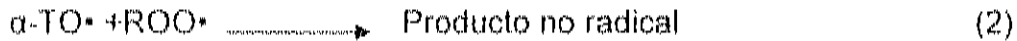
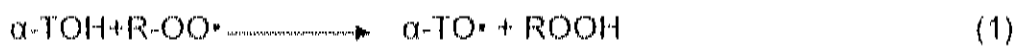
Propiedades antioxidantes

La vitamina E es un potente antioxidante liposoluble, de la cual se pueden encontrar tocoferoles y tocotrienoles derivados del 6-cromanol, con una cadena alifática lateral. El compuesto de mayor actividad biológica es α -tocoferol y constituye, aproximadamente del 90-100% de la vitamina E (Packer y Col., 2001). Contiene un anillo aromático sustituido y una cadena lateral hidrocarbonada larga. La cadena hidrofóbica es el medio por el cual el tocoferol se inserta en las lipoproteínas o se ancla en las membranas próximas a ácidos grasos insaturados (Brigelius-Floé y Traber, 1999). Está presente en prácticamente en todas las membranas celulares, con mayor concentración en las membranas del aparato de Golgi y de los lisosomas (Quinn, 2004).

Una de las funciones más importantes de la vitamina E (α -tocoferol) es neutralizar los radicales libres producidos por la oxidación. Es el antioxidante

más importante en las membranas biológicas. Mediante reacciones de oxidación-reducción del anillo aromático, inactiva a las formas más reactivas del oxígeno para neutralizarlos (Brigelius-Floé y Traber, 1999).

Los tocoferoles reaccionan con los radicales libres de la siguiente manera:



La reacción 1 ocurre cuando el tocoferol dona su átomo de hidrógeno del hidroxilo, a un radical peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) para formar un hidroperóxido lipido (ROOH), mientras se convierte en un radical libre, ($\alpha\text{-TO}\cdot$). El radical tocoperoxil reacciona ya sea con otro radical peroxil para formar un producto no radical inactivo (reacción 2) o se convierte otra vez a tocoferol por otros agentes reductores, como el ácido ascórbico (Pinelli-Saavedra, 2001).

Propiedades inmunomoduladoras

Diferentes autores han reportado propiedades inmunomoduladoras de la vitamina E en modelos animales y humanos. En ratones adultos o jóvenes infectados con virus de la influenza y suplementados con vitamina E, aumentó la eliminación del virus. Estos resultados sólo se observan en ratones adultos. Los autores atribuyen estos resultados al estímulo que ejerce la vitamina E sobre el sistema inmune deprimido por el envejecimiento (Hayek y Col., 1997).

En otro estudio con ratas infectadas con el retrovirus LP-BM5, Wang y Col., (1995), demostraron que con dosis altas de vitamina E se modula la producción de citocinas, restaurando los niveles de IFN- γ e IL-2 producida por

esplenocitos. El resultado se tradujo en una mejoría de la respuesta inmune durante la evolución del síndrome de inmunodeficiencia adquirida en este modelo experimental (Wang y Col., 1994).

El uso de la vitamina E en humanos ha presentado resultados similares a los modelos animales. En un estudio doble ciego con placebo en el grupo control, Meydani y Col., (1990) examinaron los efectos de una suplementación dietaria con vitamina E (800 UI/día dl- α tocoferol) en 32 ancianos sanos durante un mes. Los resultados mostraron mejor respuesta cutánea de hipersensibilidad de tipo tardío, y un aumento de la proliferación de linfocitos y producción de IL-2 inducida por concanavalina A (ConA). También se observó un descenso de la formación de prostaglandina E₂ (PGE₂) por monocitos de sangre periférica.

En otro estudio, Meydani y Col., (1997), investigaron los efectos de la suplementación con vitamina E a largo plazo en adultos mayores saludables sobre la respuesta inmune de tipo celular. Participaron 88 personas mayores de 65 años, que recibieron en forma aleatoria, placebo o vitamina E en dosis de 60, 200 u 800 mg/día durante 235 días. Los autores concluyeron que con dosis de vitamina E mayores a las recomendadas, aumentaron los índices clínicamente relevantes de función mediada por células T como son: la respuesta cutánea de hipersensibilidad de tipo tardío, la respuesta de anticuerpos a vacunas contra la hepatitis y el tétanos.

Malmberg y Col., (2002) estudiaron 12 pacientes inmunocomprometidos y con cáncer colorrectal avanzado cuyos linfocitos presentan defectos para producir citocinas Th1 cuando se estimulan con mitógenos. Después de suplementar con 800 UI/día de vitamina E durante 15 días, los pacientes aumentaron la relación de los linfocitos CD4:CD8 y la producción de IL-2 e IFN- γ .

Estos resultados sugieren que la vitamina E tiene propiedades inmunomoduladoras, las cuales podrían aprovecharse para mejorar la respuesta inmune de pacientes con enfermedades que presentan deficiencia de citocinas de tipo Th1, en especial de IFN- γ , como es el caso de la tuberculosis.

Mecanismo de acción

No se conoce con certeza el mecanismo de acción de la vitamina E para mejorar la respuesta inmune, al menos no el mecanismo que utiliza para mejorar la producción de citocinas. Se sabe que la vitamina E modula la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Wu y Col., 2001). Wu y Col., (1998), determinaron que la vitamina E regula positivamente la actividad de la ciclooxigenasa (COX). Los resultados mostraron que la suplementación dietaria con vitamina E reduce la producción de PGE₂ sugiriendo que el mecanismo es la supresión de la actividad de COX-2 a nivel post transcripcional. Por su parte Beharka y Col., (2002), en un estudio experimental en macrófagos de ratones viejos y jóvenes alimentados con 30 o 500 ppm de vitamina E, comprobaron que ésta inhibe la actividad de la ciclooxigenasa (COX) al disminuir la formación de peroxinitrito, lo que lleva a menor formación de PGE₂.

Adolfsson y Col., (2001), evaluaron el efecto de la vitamina E sobre el sistema inmune de ratones viejos, utilizando células T purificadas sin la influencia de la PGE₂ de macrófagos. Estos autores demostraron que la vitamina E mejora la función de las células T, independientemente de los efectos de la PGE₂. Se aumentó la producción de IL-2 en las células T vírgenes, sin efecto sobre las células de memoria.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio

Tamaño de muestra

Considerando que la diferencia en el IFN- γ producido por CMN de sujetos con tuberculosis activa y controles saludables con PPD+ es de 211.36 pg/ml \pm 323 (Cubillas-Tejeda y Col., 2003), se calculó un tamaño de muestra de 8 pacientes por grupo para obtener una potencia de 0.80 y α de 0.05 (Minitab 13.3 Inc. USA).

Criterios de inclusión

- Pacientes adultos, negativos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-), ambos géneros, con diagnóstico clínico, radiográfico y bacteriológico reciente de tuberculosis pulmonar, sin tratamiento previo, que solicitaron atención médica en centros de salud de la Secretaría de Salud
- Adultos varones y mujeres saludables no suplementados con vitamina E, con intradermorreacción positiva (\geq 10 mm de induración) al PPD
- Las personas aceptaron participar en el estudio en forma voluntaria, con firma de consentimiento, en presencia de dos testigos. El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. y por la Dirección

de Enseñanza e Investigación de la Secretaría de Salud en el Estado.

Criterios de exclusión

- Portadores del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH+)
- Desnutrición severa
- Alcoholismo o consumo de drogas ilícitas
- Embarazo
- Cáncer
- Consumo habitual de vitamina E o suplementos que la contengan
- Uso de medicamentos inmunosupresores

Criterios de eliminación

- Viabilidad celular menor del 95%
- Baja cuenta celular

Diseño del Estudio

Arreglo factorial ($Y_{ijk} = A + B + AB + E_{ij}$)

Donde Y_{ijk} es la variable respuesta, el factor A es la condición de los sujetos, el factor B, son los tratamiento, AB la interacción de ambos factores y E_{ij} el error experimental.

Factor A (Grupos)

1. CMN de pacientes con tuberculosis activa (suplementadas y no suplementadas con vitamina E)
2. CMN de sujetos saludables PPD+ (suplementadas y no suplementadas con vitamina E)

Factor B (Tratamientos)

- A. Control negativo
- B. PHA
- C. Antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD o extracto crudo de proteínas de sobrenadante de cultivo)

Variables de respuesta

1. Proliferación de CMN
2. Porcentajes de células productoras de IFN- γ e IL-2
3. Cantidad de IFN- γ en sobrenadante de cultivos de CMN
4. Incorporación de vitamina E por CMN

Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA para comparación de medias entre grupos, t de student para medias entre dos grupos, con nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Se utilizó el paquete estadístico Minitab 13.3 (Minitab Inc. USA) y NCCS 1997.

Técnicas de Laboratorio

Preparación de vitamina E

Se preparó un stock de solución α -Tocoferol (Sigma Lot 032k1243) en etanol absoluto. Se tomaron 4.34 mg de vitamina E y diluyeron en 10 mL de etanol para obtener una concentración final de 0.1 M. De la solución anterior se preparó una solución 2.32 mM en suero fetal bovino (SFB) y se incubó 1 h en oscuridad a 37° C. Se congeló en alícuotas de 1 mL y se utilizaron para cada experimento.

Separación de células mononucleares (CMN)

Se extrajeron 30 mL de sangre en tubos con heparina (Vacutainer) por punción de la vena antecubital. Las CMN de sangre periférica se separaron por el método de gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque™, Amersham Biosciences). Por cada 2 mL de sangre se utilizó 1 mL de ficoll. En tubos estériles se depositó el ficoll y se agregó la sangre vertiéndola con cuidado sobre la pared del tubo. Se centrifugó a 1500 r.p.m., durante 20 minutos, en centrífuga refrigerada a 4°C (Beckman GS 15R). Se extrajo la capa de CMN con pipeta Pasteur y se lavó dos veces con RPMI-1640 durante 10 minutos a 1200 r.p.m. El botón de CMN se resuspendió en 4 mL de medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con suero fetal bovino al 10%. La viabilidad se evaluó con azul tripano y las células se cuantificaron en un hemocitómetro (Newbauer).

Incorporación de vitamina E a CMN

Las CMN se ajustaron a 2.5×10^6 células/mL y 4.8 mL de esta suspensión se incubó 4 horas con 50 μ M de vitamina E en medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal bovino. Al término de la incubación las CMN se lavaron dos veces con RPM 1640 sin SFB para finalmente, resuspenderlas en 4.8 mL de medio RPMI suplementado con SFB al 10% para conservar la relación inicial de 2.5×10^6 células/mL.

Ensayo de proliferación

Las CMN se cultivaron en microplacas de cultivo de 96 pozos, por triplicado, y se estimularon con PHA (12 μ g/mL), 10 μ g/mL de antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* o sin estímulo. Por cada pozo se adicionaron 100 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, y 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomina, 2 mM de L-Glutamina y 0.05 mM de β -mercaptoetanol. El periodo de incubación fue de 6 días, a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, 18 horas antes de la cosecha, se agregaron 25 μ L de timidina tritiada (1 μ Ci) por pozo. Al final de la incubación las CMN se cosecharon en papel filtro. Se colocaron en viales a los que se agregó 2 mL de líquido para contador de centelleo y se leyeron con un contador beta. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm).

Determinación de vitamina E en CMN por HPLC

La incorporación de vitamina E se midió en 4×10^5 células precargadas con vitamina E, como se describió previamente, y en la misma cantidad de

células sin vitamina. La extracción de vitamina E se llevó a cabo de acuerdo a Pinelli-Saavedra (2001). La suspensión de CMN se centrifugó en tubos Ependorff a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se procedió a lavar dos veces el botón de células con RPMI sin SFB, resuspendiendo en 500 μ L de RPMI 1640 sin SFB. Se agregaron 500 μ L de etanol BHT al 0.025% agitando durante 10 seg. Se adicionaron 700 μ L de hexano BHT al 0.025% seguido de 10 minutos de agitación. Enseguida se centrifugó a 14,000 r.p.m. durante 10 minutos. Al final se extrajo el sobrenadante de hexano que y se dejó evaporar durante toda la noche. La reconstitución se realizó con 500 μ L de metanol BHT al 0.025% y se inyectó por triplicado en cromatógrafo de líquidos (HPLC).

Condiciones de HPLC

Para la cuantificación de la vitamina E por HPLC se empleó una bomba de solventes Varian Pro-Star isocrática modelo 220, un inyector Rheodyne modelo 7125 utilizando un loop de 10 μ l y un detector UV-Visible de longitud de onda variable Varian 9050. La fase estacionaria fue una columna microsorb-short one de 10 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno, empacada con C-18 la cual tiene 3 μ m de tamaño de partícula y 100 μ m de tamaño de poro. La fase móvil fue metanol grado HPLC y agua HPLC (98:2).

Producción de interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2)

En placas de 96 pozos se incubaron 5×10^5 CMN precargadas con vitamina E y sin vitamina E, en RPMI-1640 completo suplementado con SFB al 10%. Se estimularon con PHA o PPD durante 24 horas. Después de 14 h de

incubación a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, se agregó brefeldina (BFA, 10 µg/mL) para inhibir la secreción de citocinas. Después de 4 horas se marcaron con anticuerpos monoclonales para CD3 y, posteriormente, se permeabilizaron con saponina al 0.1% para marcar con anticuerpos monoclonales contra IFN-γ y contra IL-2 y finalmente fijarlas con formaldehído para su análisis en citómetro de flujo con el software Cell-Quest.

RESULTADOS

Sujetos de Estudio

En el estudio participaron 17 pacientes con tuberculosis activa y 11 controles saludables PPD+, con las siguientes características demográficas: el grupo de enfermos estuvo constituido por 10 hombres con edad promedio \pm DE de 60.2 ± 15.6 años y 7 mujeres con edad promedio \pm DE de 50.2 ± 19.2 años. El grupo de controles saludables estuvo conformado por 6 hombres con edad promedio \pm DE de 36.5 ± 15.8 años y 5 mujeres con edad promedio \pm DE de 43 ± 12.7 años.

El diagnóstico de tuberculosis se estableció de acuerdo a los criterios recomendados por la Norma Oficial Mexicana (NOM 0006 SSA, 1993) y se tomaron en consideración: síntomas, anomalías radiográficas, baciloscopia en expectoración positiva, por presencia de bacilos ácido alcohol resistentes procesadas en laboratorios certificados por la misma Secretaría de Salud. En ambos grupos, se aplicó la intradermoreacción, el promedio de la induración de los enfermos fue de 5.7 ± 3 mm, en los controles saludables PPD+, de 26 ± 4 mm.

Curva de Estimulación

Para evaluar la proliferación de las CMN ante el estímulo con antígenos de *M. tuberculosis* y determinar la cantidad necesaria para los experimentos posteriores, se realizó una curva de estimulación con tres sujetos saludables, aplicando diferentes concentraciones del antígeno, en placas de 96 pozos. Se incubaron 2.5×10^3 CMN en medio RPMI suplementado con SFB al 10%, en

presencia de 0, 10, 50 y 100 µg/ml. de antígeno. Como control positivo se utilizó el antígeno policlonal PHA. Las células se cosecharon a las 72 h y las estimuladas con antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (AgMtb) se cosecharon a los 6 días. En ambos casos se marcaron con timidina tritiada, 18 horas antes de ser cosechadas. Los resultados mostraron que el mejor estímulo se obtuvo con 10 µg lo cual concuerda con otros reportes (Zhang y Col., 1995; Antas y Col., 2004) por lo que se decidió utilizar esta cantidad de antígeno en los experimentos subsecuentes. En la figura 1 se muestra que la proliferación con PHA resultó mayor con respecto al control negativo y al estímulo con antígeno de *M. tuberculosis*. Con relación al estímulo específico se observó mayor proliferación cuando se estimuló con 10 µg y que la respuesta disminuyó a medida que se aumentó la concentración del estímulo.

Proliferación de CMN

Una vez que se determinó la cantidad de antígeno necesaria para una correcta estimulación de las CMN, se procedió a evaluar el efecto de la vitamina E. Los siguientes datos corresponden a 8 enfermos y 5 sujetos saludables PPD+.

Los promedios \pm SE se muestran en la Tabla 1. El análisis de varianza no mostró diferencia en la proliferación entre grupos de sujetos enfermos y saludables PPD+, ($p= 0.1$). Sólo se observa una tendencia de mayor proliferación en el grupo de sujetos saludables PPD+ (Figura 2).

Con relación a los tratamientos, la diferencia fue significativa entre los grupos tratados con antígeno de *M. tuberculosis* y AgMtb más vitamina E con respecto al control ($p= 0.01$). La capacidad de proliferación no mostró diferencia significativa entre grupos, aunque se observa una tendencia de mayor proliferación en el grupo de sujetos saludables.

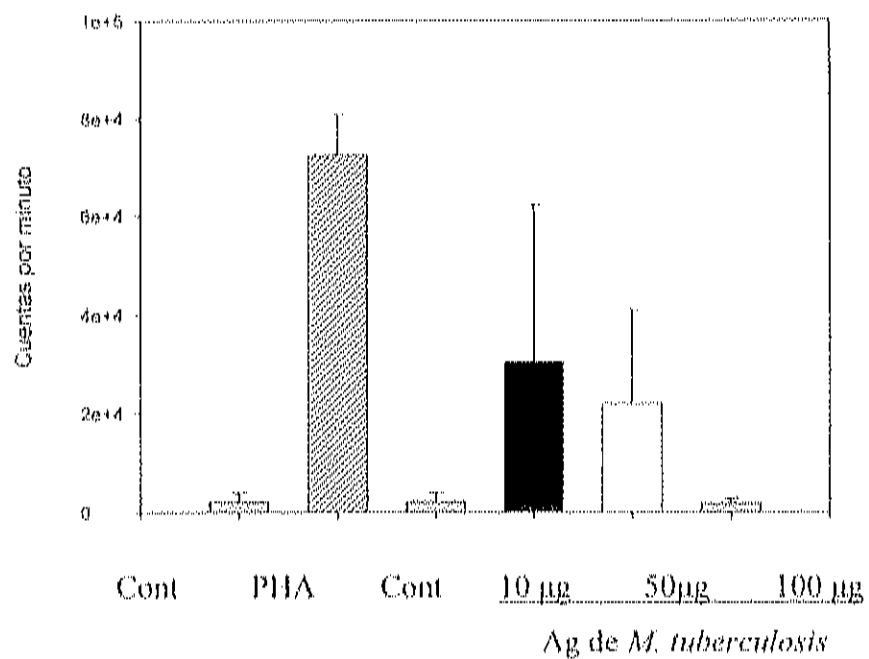


Figura 1. Curva de proliferación con diferentes concentraciones de antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*. En placas de 96 pozos se cultivaron 2.5×10^5 CMN con PHA durante 72 horas y con AgMtb durante 6 días. A 18 h antes de cosecharlas, se marcaron con timidina tritiada y se contaron en un contador de radiación beta.

Grupo y tratamiento	(n)	Promedio	Error estándar
PPD, Cont.	5	1789	4826
PPD, AgMtb10	5	22085 ^a	4826
PPD, AgMtb E	2	18734	7632
TB, Cont.	8	3488	3816
TB, AgMtb10	8	7048	3816
TB, AgMtb E	5	11398 ^a	4826

Tabla 1. Proliferación de CMN de sangre periférica de pacientes con tuberculosis y sujetos saludables PPD+. Las CMN fueron estimuladas con antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* con y sin vitamina. PPD: sujeto saludable PPD+; TB: Paciente con tuberculosis activa; AgMtb10: 10 µg de Antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*; AgMtb E: Antígeno de *Mycobacterium tuberculosis* más vitamina E 50 µM. Letras diferentes p<0.05.

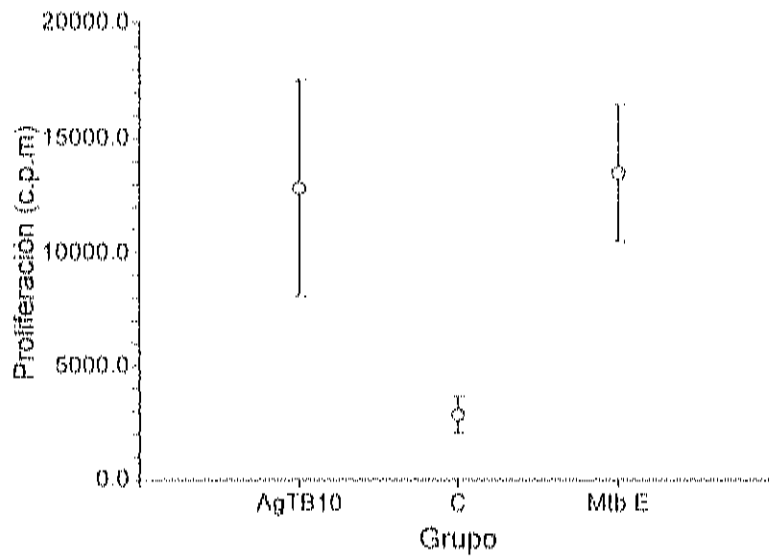


Figura 2. Proliferación de CMN con diferentes estímulos. La respuesta de proliferación de CMN de los sujetos saludables PPD+, muestran una tendencia de mayor proliferación que los enfermos, cuando son estimuladas con Ag de *M. tuberculosis* y con Ag más vitamina E. La diferencia no alcanza significancia ($p > 0.05$).

Sin embargo, no hubo diferencia en ambos grupos cuando se estimularon con antígeno de micobacteria más vitamina E, sugiriendo que la vitamina E no modifica la proliferación, la cual fue semejante ante el estímulo con el antígeno solo. Esto hace suponer que la respuesta fue por el antígeno ya que la diferencia con el control fue significativa ($p < 0.05$).

Incorporación de Vitamina E

Para precargar a las CMN con vitamina E, se probaron diferentes condiciones. En los experimentos preliminares, se midió la vitamina E en CMN y en el sobrenadante del cultivo para asegurar la presencia de la vitamina. El mejor resultado se obtuvo incubando 4×10^6 CMN durante 4 horas con $50 \mu\text{M}$ de vitamina E en RPMI suplementado con SFB al 10% e incubación a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. La Figura 3 muestra los datos de un experimento representativo de un sujeto sano.

Posteriormente, siguiendo la metodología descrita anteriormente, se analizó la incorporación de vitamina E en cuatro sujetos saludables y seis pacientes con tuberculosis. La Figura 4 muestra la concentración antes y después de la suplementación en los grupos de sujetos saludables y enfermos. El promedio sin vitamina E fue de $0.89 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ y después del suplemento aumentó a $1.54 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ ($p > 0.07$). Los enfermos tuvieron concentraciones de $0.8 \pm 0.23 \mu\text{g/ml}$ sin suplementación y con el suplemento alcanzó $1.50 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). No se encontró diferencia significativa entre grupos de enfermos y saludables ($p > 0.05$). Como puede observarse, en ambos grupos se registró un incremento de vitamina E no significativo, sin embargo, no se sabe si este incremento puede tener efectos biológicos.

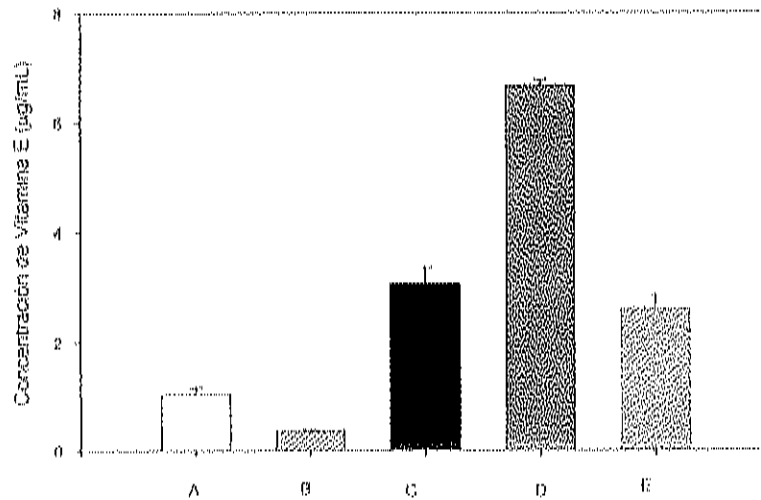


Figura 3. Incorporación de vitamina E en CMN de sujeto saludable. Se incubó 4×10^6 CMN durante 4 horas en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y vitamina E 50 μ M. A: CMN sin vitamina, B: Sobrenadante sin vitamina E, C: CMN suplementadas con 50 μ M de vitamina E, D: sobrenadante suplementado con 50 μ M de vitamina E y E: Suero.

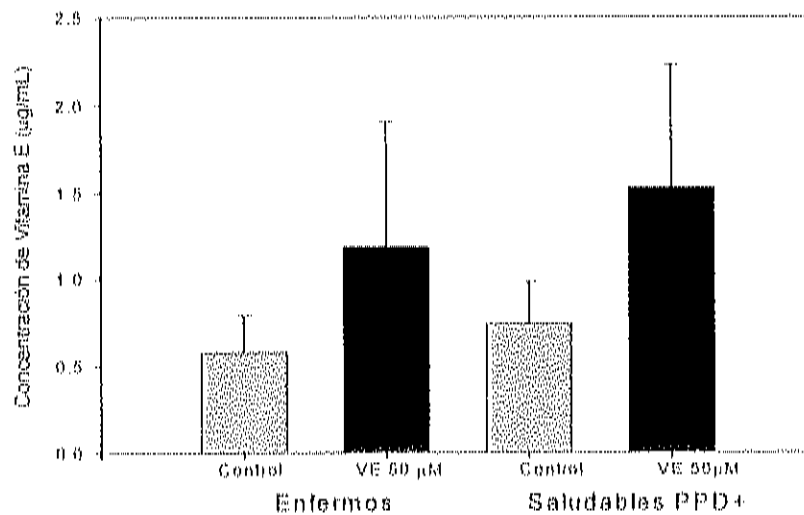


Figura 4. Incorporación de vitamina E en CMN de enfermos y sujetos saludables PPD+. Se observa que la concentración de vitamina E tiende a aumentar después de la suplementación en los saludables, sin embargo este aumento sólo es significativo en los enfermos.

Determinación de Citocinas Intracelulares

Interferón- γ (IFN- γ)

Debido a que el IFN- γ tiene un papel fundamental en la respuesta inmune a organismos intracelulares como las micobacterias, se evaluó el porcentaje de CMN productoras de esta citocina en pacientes y sujetos saludables suplementadas o no con vitamina E y estimuladas con PPD o PHA.

El control negativo de CMN de los enfermos, mostró porcentajes de células productoras de IFN- γ de 2.8% sin suplementar y 3.1% con suplementación. Con PHA el porcentaje fue de 25 y 24.2%, sin suplementar y suplementadas, respectivamente. Con PPD se obtuvo 9.7 y 7.6%, respectivamente. El control negativo de los sujetos saludables PPD+ mostró 2.8% y 3.1 % sin y con vitamina E, respectivamente. Con PHA se obtuvo 25% sin vitamina y 24.2% con vitamina E. Con PPD la respuesta fue de 8.7 y 7.6%, respectivamente. La diferencia no fue significativa ($p>0.05$) Figura 5.

Como puede observarse, las CMN tienen capacidad de producción de citocinas, ya que responden de manera adecuada con estímulo policlonal y con PPD, sin embargo no hay cambios en presencia de vitamina E. Los resultados son similares en el grupo de sujetos saludables.

Interleucina-2 (IL-2)

Las CMN productoras de IL-2 tuvieron un comportamiento similar. El grupo de enfermos mostró 5.1% y 5% sin vitamina E y suplementadas, sin estimular (control), con PHA la respuesta fue de 27% y 30 % y con PPD de 10% y 9%. En sujetos saludables PPD+, sin estímulo fue de 4.8% y 6%, sin y con vitamina E, para PHA fue de 28% en ambas condiciones y para PPD de 8% y

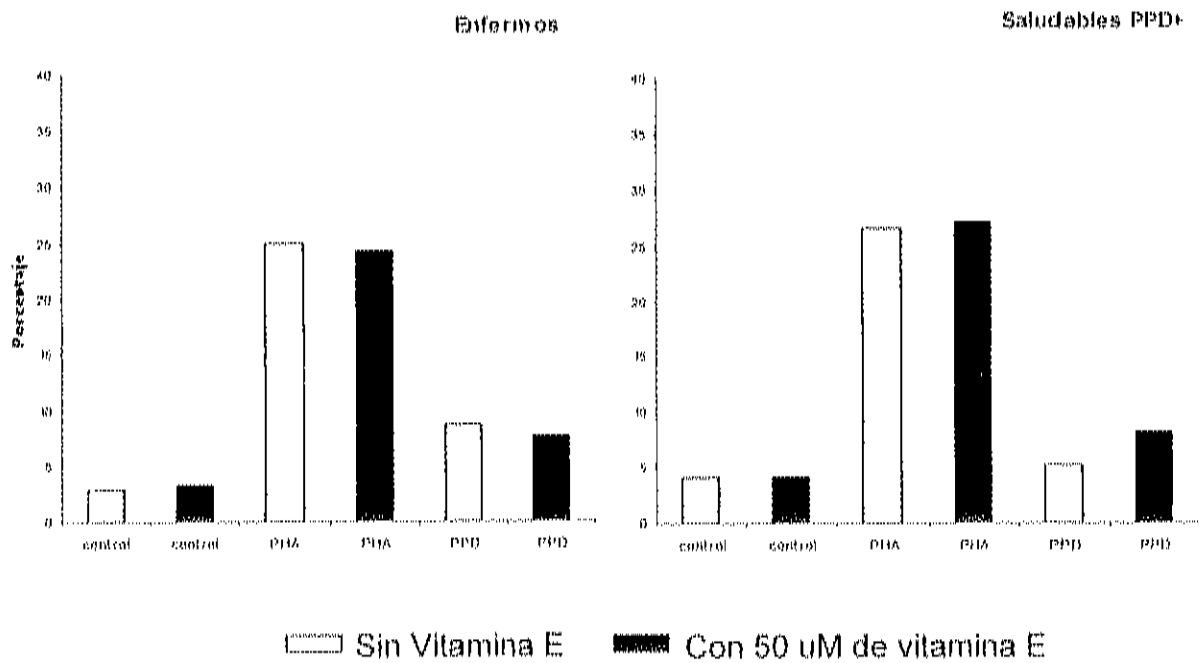


Figura 5. Resultados preliminares de producción de IFN- γ de CMN de 6 pacientes con diagnóstico de tuberculosis y 3 controles saludables PPD+. Se obtuvieron CMN, se suplementaron con 50 μ M de vitamina E durante 4 h, se estimularon como se describe durante 20 h, se marcaron con un anticuerpo anti-IFN-gamma y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados representan el porcentaje de células productoras de IFN- γ . Barras blancas sin vitamina E y barras negras con 50 μ M de vitamina E.

10% respectivamente. Las diferencias no resultaron significativas ($p>0.05$) Figura 6.

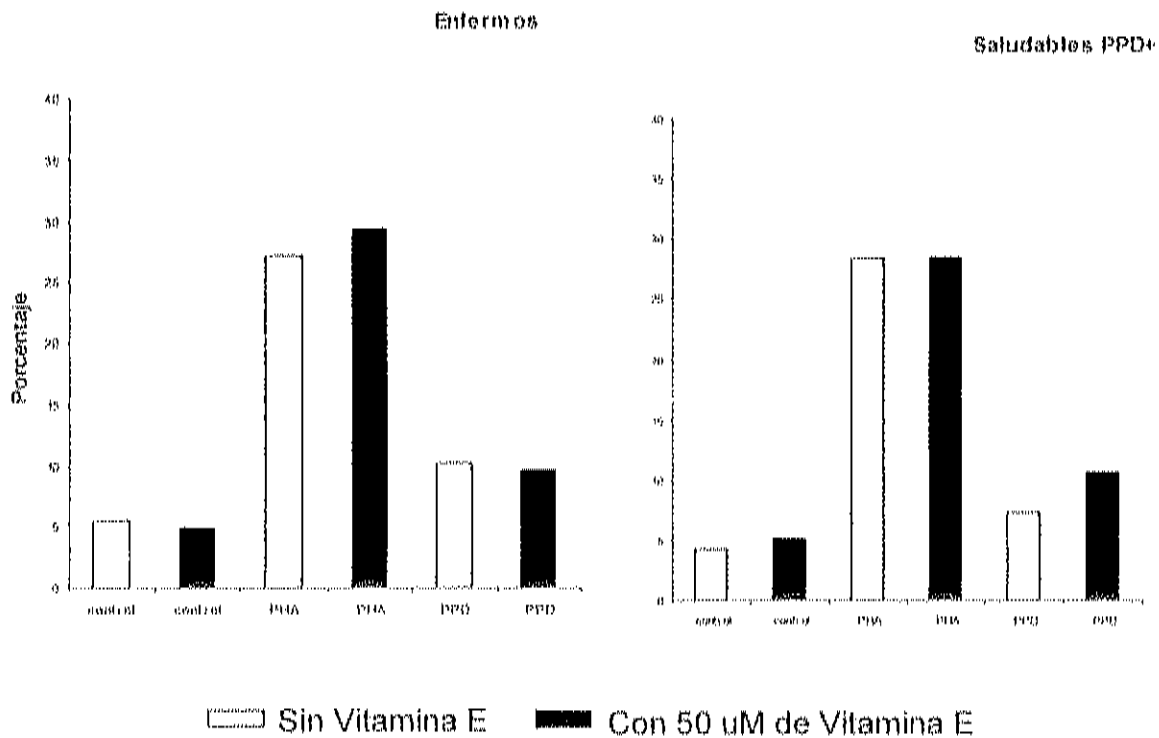


Figura 6. Resultados preliminares de producción de IL-2 de CMN de 6 pacientes con diagnóstico de tuberculosis y 3 controles PPD+. Se obtuvieron CMN, se suplementaron con 50 µM de vitamina E durante 4 h, se estimularon como se describe durante 20 h, se marcaron con un anticuerpo anti-IL-2 y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados representan el porcentaje de células productoras de IL-2. Barras blancas sin vitamina E y barras negras con 50 µM de vitamina E.

DISCUSIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública global, que requiere de soluciones que coadyuven a la eliminación y el control del bacilo en forma rápida y eficiente. En este sentido el sistema inmune tiene un papel preponderante. Por razones aún no bien determinadas, sólo una pequeña proporción de la población que ha estado en contacto con la micobacteria desarrolla la enfermedad. Se calcula que dicha proporción es de alrededor del 5%, mientras que el 95% restante muestra una respuesta inmune protectora y logra el control. Sin embargo, si se presentan las condiciones apropiadas, existe la posibilidad de una reactivación. Por esta razón, es necesario conocer los mecanismos que se habilitan en los sujetos saludables y que finalmente los protegen. Si conocemos estos mecanismos, estaremos en condiciones de buscar alternativas para hacerlos funcionar en los enfermos.

Con este objetivo se probaron los efectos potenciales de la vitamina E en CMN de enfermos con tuberculosis. Se sabe que la respuesta inmune de los enfermos con tuberculosis activa se caracteriza por presentar una respuesta de tipo Th2, con baja producción de IFN- γ e IL-2 e incremento de la IL-4 en comparación con sujetos saludables PPD+. Por otro lado, existen diversos reportes del efecto de la vitamina E sobre la respuesta inmune celular de ciertas poblaciones, por lo que se esperaba obtener una forma de estimular el sistema inmune de estos enfermos.

Los resultados de la curva de estimulación, muestran que las CMN tienen capacidad de proliferación cuando se estimulan con un antígeno policlonal como la PHA. Cuando se estimulan con antígeno de *M. tuberculosis* se obtienen resultados diferentes ya que la proliferación es menor, debido a que se estimulan clonas específicas de linfocitos T que por supuesto, se encuentran en menor número. La respuesta está en relación a la concentración del

antígeno. La mejor respuesta se obtuvo cuando se estimuló con 10 µg de antígeno. A medida que se aumenta la concentración del antígeno, la respuesta disminuye. Este efecto se debe a que las células de memoria reconocen antígenos de *M. tuberculosis* y en respuesta aumenta la proliferación. La disminución de la respuesta puede atribuirse a sobreestimulación, que favorece la apoptosis o sobreproducción de citocinas tales como el factor transformante de crecimiento-β e interleucina-10 (Delgado y Col., 2002).

Cuando se compara la respuesta proliferativa entre sujetos saludables y enfermos no se observan diferencias significativas. Este efecto posiblemente es debido a que los enfermos se estudiaron en fase temprana de la infección, con exposición a antígenos secretorios de *M. tuberculosis*, que favorece la respuesta inmune. Sin embargo un estudio realizado en enfermos activos antes de su tratamiento que se compararon con enfermos después del tratamiento efectivo, tampoco encontró diferencias en la capacidad de proliferación de CMN cuando se estimularon con BCG (Moura y Col., 2004). En ese mismo estudio, la producción de IFN-γ fue alta antes del tratamiento e incrementó después. De forma interesante, la respuesta fue mejor con BCG que cuando el estímulo fue PPD. Se sabe que PPD estimula poblaciones de células T CD4+, mientras que BCG estimula *in vitro*, CD4+ y CD8+.

Cuando se analizaron por separado, se puede apreciar que la respuesta al antígeno más vitamina E, presentó una tendencia a ser mayor que con solo el antígeno en el grupo de enfermos y en el grupo de personas sanas alcanza diferencia significativa; sin embargo, estos resultados deben ser tomados con reserva debido al tamaño de la muestra. La probable explicación es que las células respondieron con mayor eficacia en presencia de vitamina E, aunque la diferencia no fue significativa. Es probable que aumentando el tamaño de la muestra pueda observarse en forma más clara esta diferencia o bien, aumentando la concentración de vitamina E en las CMN, con mayor concentración de la suplementación o más tiempo de incubación. Otro aspecto

interesante que hay que evaluar, es el estímulo antigénico utilizado. Aunque no se ha encontrado diferencia cuando las CMN se estimulan con PPD o filtrado de cultivo, (Demissie y Col., 1999) parece que los antígenos ESAT-6 y CFP-10 inducen una mayor producción de IFN- γ .

Con respecto a la producción de citocinas, el porcentaje de células productoras de IFN- γ e IL-2 fue semejante en ambos grupos de estudio y no se observaron cambios con la suplementación *in vitro* con vitamina E a concentración de 50 μ M.

Los resultados de este estudio, no concuerdan con lo referidos en la literatura, ya que la producción de IFN- γ , medida por diferentes métodos, como citometría de flujo (García y Col., 2002), por ELISA (Torres y Col., 1997) y por RT-PCR (Zhang y Col., 1995), han descrito baja producción de IFN- γ , y algunos reportan la asociación con aumento de la IL-4. Cuando Sánchez y Col., (1994), estudiaron a 45 pacientes con tuberculosis pulmonar y 16 sujetos controles positivos a la prueba de tuberculina, encontraron, en los sujetos con tuberculosis, menos IFN- γ que en los sujetos control así como una mayor producción de IL-4. A partir de sus resultados concluyeron que los enfermos presentaron una respuesta de tipo Th2.

Es posible que la discrepancia se deba a que las CMN se estimularon por un periodo de 24 horas. Sin embargo, la respuesta al antígeno policlonal fue eficiente y además, en un estudio de cinética de respuesta de IFN- γ evaluado a las 8, 12, 20 y 24 h, el nivel más alto ocurrió a las 16 h en respuesta al estímulo con PPD, por lo que se considera que el tiempo de estimulación no fue un factor determinante de la respuesta. Entonces, ¿Por qué los enfermos y los controles saludables muestran el mismo porcentaje de células productoras de IFN- γ ? Una posible explicación es que los enfermos y los controles saludables presenten los mismos porcentajes cuando los primeros se estudian al inicio de la enfermedad, nuestros pacientes fueron de reciente diagnóstico y se estudiaron dentro de los primeros días de tratamiento. Portales-Pérez y Col., (2002)

encontraron mayor expresión de IFN- γ en respuesta a un antígeno de 30-kDa de *M. tuberculosis* en pacientes con tuberculosis que en controles saludables. Sin embargo, los niveles de IFN- γ medidos en los sobrenadantes del cultivo fueron menores en los sujetos enfermos que en sanos, por lo que suponen que las CMN de los pacientes pudieran tener un defecto en la secreción de esta citocina. En otro trabajo realizado por Cubillas-Tejeda y Col., (2003), documentaron una escasa correlación entre los niveles de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivos celulares y la expresión intracelular de esta citocina, lo cual explicaría, en parte, los resultados. Para establecer conclusiones finales, aún falta realizar la medición de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivos celulares.

Los porcentajes de CMN productoras de IL-2 siguieron un comportamiento semejante al del IFN- γ en sujetos sanos y enfermos. En ambos grupos, no se observaron cambios significativos, en CMN suplementadas con vitamina E; aun cuando en teoría se esperaba que aumentaran ambas citocinas. Entre las posibles causas que explican estos resultados se encuentran: la cantidad de vitamina E que se incorporó a la CMN, que no fue diferente en ambos grupos, y la diferencia con la concentración previa a la suplementación fue apenas significativa, por lo que no se podría asegurar que esa diferencia de vitamina tuviera un efecto biológico demostrable. Quizá hizo falta utilizar una mayor concentración o incubar durante más tiempo para obtener poblaciones realmente diferentes.

Otros estudios han mostrado cambios en la producción de citocinas Th1 asociados a la captación celular de vitamina E ($p < 0.001$; Adolfsson y Col., 2001), o concentraciones séricas (Malmber y Col., 2002; Meydani y Col., 1990). Es recomendable revisar el método de incorporación de vitamina E, antes de establecer conclusiones finales.

Recientemente, se sabe que hay dos tipos de reactores a la estimulación con antígenos de *M. tuberculosis*, los reactores altos y los reactores bajos. Los

reactores altos también producen mayor cantidad de citocinas Th1 y tienen mejor respuesta en la intradermoreacción a la tuberculina (Pasquinelli y Col., 2004). Es posible que los pacientes, de este estudio, correspondan a este grupo de enfermos y que si se siguen hasta el final del tratamiento, posean mayores probabilidades de tener una buena respuesta y control de la infección. Tal vez, aumentando el tamaño de la muestra se descubran pacientes con menor respuesta. Llama la atención que en los pacientes la intradermoreacción a la tuberculina fue menor de 10 mm de diámetro y en algunos fue negativa. Este dato no corresponde a la respuesta proliferativa ni a la producción intracelular de citocinas.

CONCLUSIONES

La mejor forma de evitar la diseminación de la tuberculosis es la interrupción de la cadena de transmisión mediante la curación de los enfermos. Aunque, el tratamiento farmacológico es efectivo tiene algunos inconvenientes y limitaciones; entre otros, la baja adherencia de los pacientes al tratamiento, la emergencia de cepas de bacilos farmacorresistentes y el costo elevado de los medicamentos considerados de segunda línea. En este sentido, la investigación de las propiedades inmunomoduladoras de la vitamina E, demostradas con anterioridad, en humanos y animales, emerge como un tópico de gran interés.

De acuerdo a los resultados de este estudio, Las CMN de los enfermos de tuberculosis y de los controles saludables PPD+ incorporaron vitamina E *in vitro* en la misma proporción. Además, la proliferación fue similar en sanos y enfermos.

Con relación al efecto de los tratamientos, se observó diferencia con respecto al control, sin que la vitamina E haya mostrado diferencia con el estímulo de antígeno de *M. tuberculosis*.

La producción de citocinas Th1 no se modificó con la suplementación con vitamina E y fue similar en sanos y enfermos.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la vitamina E no modifica la producción de citocinas Th1. Sin embargo, es necesario valorar la producción de citocinas Th1 en el sobrenadante de los cultivos celulares para una evaluación global.

REFERENCIAS

- Adolfsson, O., Huber, B.G., Meydani, S.N. (2001). Vitamin E-enhanced IL-2 production in old Mice: Naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2 producing capacity. *J Immunol*, 167:3809.
- American Thoracic Society / Centers for Disease Control and Prevention / Infectious Diseases Society of America: Treatment of Tuberculosis (2003). *Am J Respir Crit Care Med*, 167:603-662.
- Anderson, R.M., (1998). Tuberculosis: Old problems and new approaches. *Proc Natl Acad Sci*, 95:1352-1354.
- Antas, P.R.Z., Sales, J.S., Pereira, K.C., Oliveira, E.B., Cunha, K.S., Sarno, E.N., Sampaio, E.P. (2004). Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. *Braz J Med Biol Res*, 37:1119-1129.
- Beharka, A.A., Wu, D., Serafini, M., Meydani, S.N. (2002). Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radical Biology and Medicine*, 32:503-511.
- Bhattacharyya, S., Singla, R., Dey A., Prasad, H (1999). Dichotomy of Cytokine Profiles in Patients and High-Risk Healthy Subjects Exposed to Tuberculosis. *Infect Immun*, 67:5597-5603.
- Brigelius-Floë, R., Traber, M.G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 13:1145-1155.

Burdon, K., Williams, A. (1982). Microbiología. Publicaciones Cultural, S.A. Sexta reimpression, México, pags. 656-659.

Condos, R., Rom, W.N., Schluger, N.W. (1997). Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet*, 349:1513-1515.

Cubillas-Tejeda, A., Ruiz-Argüelles, A., Bernal-Fernandez, G., Quiroz-Compeán, L., López-Dávila, A., Reynaga-Hernández, E. González-Amaro, R. (2003). Cytokine production and expresión of leucocyte differentiation antigens by human mononuclear cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Scand J Immunol*, 57:115-124.

Delgado J, Tsai E, Thim S, Baena A, Boussiolis V, Reynes J, Sath S, Grosjean P, Yunis E, Goldfeld A. (2002). Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc Natl Acad Sci*, 99:7576-7581.

Demissie A, Ravn P, Olobo J, Doherty T, Eguale T, Geletu M, Hailu W, Andersen P, Britton S. (1999) T-Cell recognition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate fractions in tuberculosis patients and their household contacts. *Infect Immun*, 67:5967-5971.

Espinal, M.A., Laszlo, A., Simonsen, L., Boulahbal, F., Kim, S.J., Reniero, A., Hoffer, S., Rieder, H.L., Binkin, N., Dye, C., Williams, R., Raviglione, M.C. (2001). Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union Againsts Tuberculosis and Lung

Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. N Engl J Med, 344:1294-1303.

Fietta, A., Rancioli, C., Gialdroni, G. (2000) Mycobacterial lipoarabinomannan affects human polymorphonuclear and mononuclear phagocyte functions differently. Haematologica, 85:11-18.

Garcia, M, Vargas, J.A., Castejon, R., Navas, E., Durantez, A. (2002). Flow-cytometric assessment of lymphocyte cytokine production in tuberculosis. Tuberculosis, 82:37-41.

Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Orefici, G., Julkunen, I., Coccia, E.M. (2001). Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. J Immunol, 166: 7033-41.

Han, S.N., Meydani, S.N. (2000). Antioxidants, cytokines, and influenza infection in aged mice and elderly humans. J Infect Dis, 182:S74-80.

Hayek, M.G., Taylor, S.F., Beder, B.S., Han, S.N., Meydany, M., Smith, D.E., Eghtesada, S., Meydani, S.N. (1997). Vitamin E supplementation decreases lung virus titers in mice infected with influenza. J Infect Dis, 176(1):273-276.

Hirsch, C.S., Tootsi, Z., Othieno, C., Johnson, J., Schwander, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ.

(1999) Depressed T-Cell Interferon- γ Responses in Pulmonary Tuberculosis: Analysis of Underlying Mechanisms and Modulation with Therapy. *J infect Dis*, 180:2069-73.

Holland, S.M., Eisentein, E.M., Kuhns, D.B., Turnes, M.L., Fleisher, T.A., Strober, W., Gallin, J.I. (1994) Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma: a preliminary report. *N Engl J Med*, 330: 1348-1355.

Horwitz, M.A., Lee, B.E., Dillon, B.J., and Harth, G. (1995). Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci*, 92:1530-1534.

Jiao, X., Lo-Man, R., Guernonprez, P., Flette, L., Deriaud, E., Burgaud, S., Gicque, I. B., Winter, N., Leclerc, C. (2002). Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol*, 168: 1294-301.

Karyadi, E., West, C.E., Schultink W, Nelwan RH, Gross R, Amin Z, Dolmans W, Schiebusch H, van der Meer JW. (2002). A double-blind, placebo-controlled study of vitamin A and zinc supplementation in persons with tuberculosis in Indonesia: effects on clinical response and nutritional status. *Am J Clin Nutr*, 75:720-727.

Malmberg, K.J., Lenkel, R., Pettersson, M., Ohlum, T., Ichihara, F., Glimelius, B., Frodin, J.E., Masucci, G., Kiessling, R. (2002). A short-term dietary supplementation of high doses of vitamin E increases T helper 1 cytokine

production in patients with advanced colorectal cancer. Clin Cancer Res, 8:1772-1778.

Meydani, S.N., Barklund, M.P., Liu, S., Meydani, M., Miller, R.A., Cannon, J.G., Morrow, F.D., Rocklin, R., Blumberg, J.B. (1990). Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. Am J Clin Nutr, 52:557-563.

Meydani, S.N., Meydani, M., Blumberg, J.B., Leka, L.S., Siber, G., Loszewski, R., Thompson, C., Pedrosa, M.C., Diamond, R.D., Stollar, B.D. (1997). Vitamin E supplementation and *in vivo* immune response in healthy elderly subjects. A randomized controlled trial. JAMA, 277(17):1380-6.

Moura, E.P., Toledo, V., Oliveira, M., Spindola-de-Miranda, S., Andrade, H., Guimaraes, T. (2004). Pulmonary tuberculosis: Evaluation of interferon- γ levels as an immunological healing marker based on the response to the bacillus Calmette-Guerin. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 99(3):283-287.

Murray, C.J., Salomon, J.A. (1998). Modeling the Impact of global tuberculosis control strategies. Proc Natl Acad Sci, 15:1381-1388.

Nataraj, C.H., Thomas, D.W., Tilley, S., Nguyen, M., Mannon, R., Koller BH, Coffman TM (2001) Receptors for prostaglandin E₂ that regulate cellular immune responses in the mouse. J Clin Invest, 71: 1229-1235.

Organización Mundial de Salud:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/who104/en/index.html>

- Packer, L., Weber, S., Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of α -tocopherol antioxidant action and cell signaling. *J Nutr*, 131:369S-373S.
- Pasquinelli, V., Quiroga, M., Martínez, G., Castro, L., Musella R., Bracco, M., Belmonte, L., Malbran, A., Fainboim, L., Sieling, P., Garcia, V. (2004). Expression of signaling lymphocytic activation molecule-associated protein interrupts IFN- γ production in human tuberculosis. *J. Immunol*, 172:1177-1185.
- Perdow, S., Chan, J., Salgame, P. (2002). *Mycobacterium tuberculosis* Induces Differential Cytokine Production from Dendritic Cells and Macrophages with Divergent Effects on Naïve T Cell Polarization. *J Immunol*, 168:4636-4642.
- Pinelli-Saavedra A. (2001). Vitamin E and vitamin C supplementation of sows in a hot environment. Effects of reproductive performance piglet tissue levels and aspects of immune status. Thesis Doctor of Philosophy. University of Aberdeen.
- Portales-Perez, D.P., Baranda, L., Layseca, E., Fierro, N.A., De la Fuente, H., Rosenstein, Y., Gonzales-Amaro, R. (2002). Comparative and prospective study of different immune parameters in healthy subjects at risk for tuberculosis and in tuberculosis patients. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9:299-307.
- Quinn, P.J. (2004). Is the distribution of α -tocopherol in membranes consistent with its putative functions? *Biochemistry*, 69:74-84.

- Rook, G., Hernandez-Pando, R., Dheda, K., Seah, G.E. (2004). IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunology*, 25: 483-488.
- Sanchez, F.O., Rodriguez, J.I., Agudelo, G., Garcia, L.F. (1994). Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. *Infect immune*, 62:5673-5678.
- Secretaría de Salud. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM 0006 SSA 1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la Salud. Diario Oficial de la Federación. México 23 de marzo del 2000.
- Schluger, N., Rom, W. (1998). The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:679-691.
- Schwander, S.K., Torres, M., Carranza, C.C., Escobedo, D., Tary-Lehmann, M., Anderson P., Toossi, Z., Ellner, J.J., Rich, E.A., Sada, E. (2000) Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community. *J Immunol*, 165:1479-1485.
- Torres, M., Herrera, T., Villarreal, H., Rich, E., Sada, E.(1997) Cytokine Profiles for Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis and Healthy Household Contacts in response to the 30-kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 66:176-180.

- Van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., Van der Meer, J.W. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev, 15:294-309.
- Wang, Y., Huang, D.S., Wood, S., Watson, R.R. (1995). Modulation of immune function and cytokine production by various levels of vitamin E supplementation during murine AIDS. Immunopharmacology, 29(3):225-33.
- Wang, Y., Huang, D.S., Eskeleson, C.D., Watson, R.R. (1994). Long-term dietary vitamin E retards development of retrovirus-induced dysregulation in cytokine production. Clin Immunol Immunopathol, 2:70-75.
- Wayne, L.C. (2002). Dormancy of *M. tuberculosis* and latency of disease. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 1994; 13:908-914. DOHERTY, T.M. Immune Responses to the *Mycobacterium tuberculosis* –Specific Antigen ESAT-6 Signal Subclinical Infection among Contacts of Tuberculosis Patients. J Clin Microbiol, 40:704-706.
- World Health Organization (1999). What is DOTS? A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy known as DOTS. WHO/CDS/CPC/TB/99.270. Geneva, Switzerland: World Health Organization; www.who.int/gtb/dots
- Wu, D., Hayek, M.G., Meydani, S.N. (2001). Vitamin E and macrophage cyclooxygenase regulation in the aged. J Nutr, 131: 382S-388S.
- Wu, D., Mura, C., Beharka, A., Han, S.N., Paulson, K., Hwang D, Meydani SN (1998). Age-associated increase in PGE₂ synthesis and COX activity in

murine macrophages is reversed by vitamin E. *Am J Physiol*, 275: C661-C668.

Zhang, M., Lin, Y., Iyer, D.V., Gong, J., Abrams, J.S., Barnes, P.F. (1995). T-cell cytokine response in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 63:3231-3234.

Zhang, M., Gong, J., Presky, D., Xeu, W., Barnes, P. (1999). Expression of IL-2 Receptor β 1 and β 2 Subunits in Human Tuberculosis. *J Immunol*, 162:2441-2447.