



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**EFEITOS IMUNOLÓGICOS DA INGESTÃO DO  
PRODUTO DE SOJA FERMENTADO EM RATOS  
INDUZIDOS QUIMICAMENTE COM  
CÂNCER DE CÓLON**

**FERNANDA PAULIN BENZATTI**

Araraquara – SP  
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**EFEITOS IMUNOLÓGICOS DA INGESTÃO DO  
PRODUTO DE SOJA FERMENTADO EM RATOS  
INDUZIDOS QUIMICAMENTE COM  
CÂNCER DE CÓLON**

FERNANDA PAULIN BENZATTI

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas – Câmpus de  
Araraquara – UNESP, como requisito  
para a obtenção do título de Mestre em  
Análises Clínicas

Orientadora: Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Araraquara – SP  
2007

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Araraquara com auxílio de bolsa CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

*Aos meus pais, Benedicto e Rita,*

*que me ensinaram a ser quem eu sou, os quais sempre demonstram com seus exemplos, como diferenciar o certo do errado. Obrigada pelo amor, apoio e incentivo. Obrigada pela dedicação, pela amizade, pelo companheirismo. Obrigada pelas mãos entrelaçadas na minha, doando-me confiança, na certeza de estar indo por caminhos seguros e na certeza de que terei sempre onde amparar caso eu tropece. Amo vocês!*

*Aos meus irmãos, Paulo e Renata,*

*por todo amor, carinho e incentivo.*

*Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora profa. Dra. Tracilda Zeppone Carlos, pela confiança, incentivo e dedicação.*

*À profa. Dra. Celeni Mara Marzocchi Machado por todos os ensinamentos, amizade e valiosa contribuição através da participação nas bancas de qualificação e defesa do meu trabalho.*

*À profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli pela valiosa contribuição e colaboração durante a defesa do meu trabalho.*

*À profa. Dra. Célia Lucia de Lucas Fortes Ferreira pela valiosa contribuição durante minha qualificação.*

*À Marisa Campos Polesi Placeres pela possibilidade de aprender com sua dedicação, simplicidade e cumplicidade. Sou eternamente grata.*

*À Michelle Corrêa da Rocha por sua amizade e companheirismo. Por fazer parte dos melhores momentos de minha vida (U2, Coldplay, Aerosmith, e os muitos que ainda estão por vir). Merci beaucoup ma chère amie.*

*À Micheli Fernanda Sassá pelas valiosas sugestões, apoio, amizade e companheirismo. Muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar.*

*À Flávia Cristine Mascia Lopes por sua amizade e ajuda nos momentos mais difíceis. Sempre me salvando nos momentos de aperto. Companheira nos passeios culturais e gastronômicos.*

*À Danielle Geraldo Cardoso Maia, minha amiga dengosa, por sua amizade. Obrigada pelos momentos de alegria e descontração.*

*Aos amigos do Departamento de Imunologia: Ana Elisa, Ângela, Camila, Carol, Cleni, Danielle, Djamilé, Fernanda, Flávia, Francini, Marisa, Micheli, Michelle, Oedem e Paulinha, pelos bons momentos de convivência.*

*À amiga Sandra, "pseudo-co", obrigada pela amizade, por sempre me incentivar a seguir em frente e nunca desistir.*

*À amiga e "cunha" de coração Alessandra, obrigada pela amizade e grande paciência com que sempre me ouviu.*

*Às funcionárias da pós-graduação Cláudia, Sônia e Laura pela atenção e orientação.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.*

*Ao Dr. Arnaldo Buainain pelo apoio e incentivo.*

*A toda minha família que sempre me incentivou e me faz muito feliz.*

*À Irani e Sônia, bibliotecárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pela colaboração na correção das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.*

*Aos amigos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	IV
LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	VI
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Produtos fermentados: importância através dos tempos.....	2
1.2. O câncer e o Sistema imune.....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivo Específico.....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Fluxograma.....	26
3.1.1. Indução química do tumor.....	26
3.1.2. Obtenção das células do exsudato peritoneal.....	27
3.2. Obtenção dos produtos fermentados de soja.....	28
3.2.1. Produto fermentado.....	28
3.2.2. Produto fermentado suplementado com cálcio.....	28
3.3. Animais.....	28
3.4. Administração dos produtos de soja.....	29
3.5. Protocolo Experimental.....	29
3.6. Indução química do câncer de cólon em animais.....	30
3.7. Sacrifício dos animais.....	30



3.8. Obtenção de células do exsudato peritoneal (PEC).....	30
3.9. Obtenção de células totais de baço.....	31
3.10. Avaliação da viabilidade celular dos macrófagos.....	32
3.11. Avaliação da estimulação de macrófagos.....	33
3.11.1. Determinação da produção de Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por macrófagos peritoneais de ratos.....	33
3.11.2. Determinação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de ratos.....	34
3.11.3. Determinação da produção das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ e IL-4.....	35
3.12. Análise Estatística.....	37
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1. Determinação da viabilidade celular de macrófagos.....	39
4.2. Avaliação da produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN) em culturas de macrófagos peritoneais de ratos.....	41
4.2.1. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	41
4.2.2. Determinação da produção de óxido nítrico (NO).....	43
4.3. Determinação das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ e IL-4.....	45
4.3.1. Determinação da produção de IL-1 $\beta$ .....	45
4.3.2. Determinação da produção de TNF- $\alpha$ .....	47
4.3.3. Determinação da produção de IL-6.....	49
4.3.4. Determinação da produção de IFN- $\gamma$ .....	51
4.3.5. Determinação da produção de IL-4.....	53
4.4. Análise da correlação entre os mediadores.....	55

<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>99</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	100
<b>Tabela 2:</b> Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	101
<b>Tabela 3:</b> Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	102
<b>Tabela 4:</b> Concentração de IL-1 $\beta$ produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	103
<b>Tabela 5:</b> Concentração de TNF- $\alpha$ produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	104
<b>Tabela 6:</b> Concentração de IL-6 produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	105
<b>Tabela 7:</b> Concentração de IFN- $\gamma$ produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	106
<b>Tabela 8:</b> Concentração de IL-4 produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	107
<b>Tabela 9:</b> Correlação entre os parâmetros imunológicos analisados nos diversos grupos de tratamento.....	55

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	40
<b>Figura 2:</b> Produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	42
<b>Figura 3:</b> Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	44
<b>Figura 4:</b> Concentração de IL-1 $\beta$ produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	46
<b>Figura 5:</b> Concentração de TNF- $\alpha$ produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	48
<b>Figura 6:</b> Concentração de IL-6 produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	50
<b>Figura 7:</b> Concentração de IFN- $\gamma$ produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	52
<b>Figura 8:</b> Concentração de IL-4 produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.....	54

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

° C	-	graus Celsius
OH	-	radical hidroxila
μmols	-	micromols
μg	-	microgramas
μL	-	microlitro
ANOVA	-	análise de variância
BAL	-	bactérias ácido lácticas
BSA	-	albumina de soro bovino
CEA	-	antígeno carcinoembrionário
CO <sub>2</sub>	-	dióxido de carbono
ConA	-	concanavalina A
DC	-	células dendríticas
DMH	-	1,2 dimetilhidrazina
DNA	-	ácido desoxiribonucléico
ELISA	-	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
eNOS	-	óxido nítrico sintase endotelial
ERO	-	espécies reativas do oxigênio
ERN	-	espécies reativas do nitrogênio
EUA	-	Estados Unidos da América
g	-	grama
h	-	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	peróxido de hidrogênio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	ácido sulfúrico

IgA	-	imunoglobulina A
IL	-	interleucina
IL-1 $\beta$	-	interleucina-1 $\beta$
IL-2	-	interleucina-2
IL-4	-	interleucina-4
IL-5	-	interleucina-5
IL-6	-	interleucina-6
IL-8	-	interleucina-8
IL-10	-	interleucina-10
IL-12	-	interleucina-12
IFN-gama	-	interferon-gama
INCA	-	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	-	óxido nítrico sintase induzível
kg	-	kilograma
L	-	litro
LPS	-	lipopolissacarídeo
mg	-	miligrama
MAPA	-	Ministério da Agricultura e do Abastecimento
MHC	-	complexo principal de histocompatibilidade
min	-	minuto
mL	-	mililitro
mm	-	milímetro
mM	-	milimolar
MTT	-	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-brometo de difeniltetrazólio
NaCl	-	cloreto de sódio

NaNO <sub>2</sub>	-	nitrito de sódio
NaOH	-	hidróxido de sódio
ng	-	nanogramas
NK	-	<i>natural killer</i>
nm	-	nanômetro
nmoles	-	nanomoles
nNOS	-	óxido nítrico sintase neuronal
NO	-	óxido nítrico
NOS	-	óxido nítrico sintetase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	ânion superóxido
O <sub>2</sub>	-	oxigênio
ONOO <sup>-</sup>	-	peroxinitrito
ONOOH	-	ácido peroxinitroso
PBS	-	solução salina tamponada de fosfato
PBS-T	-	solução salina tamponada de fosfato-Tween
PDGF	-	fator de crescimento derivado de plaqueta
PEC	-	células do exsudato peritoneal
pg	-	picograma
PG-E2	-	prostaglandina-E2
RPMI-1640	-	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura) – série 1640
SOD	-	superóxido dismutase
TGF-β	-	fator de crescimento e transformação-β
Th1	-	linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	-	linfócitos T <i>helper</i> 2
TNF-alfa	-	fator de necrose tumoral-alfa

UNISOJA	-	Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja
UV	-	ultravioleta
Zimosan A	-	parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>



## RESUMO

O câncer é o principal problema mundial de saúde e nos últimos anos o Brasil obteve um avanço considerável no índice de mortalidade por câncer. O câncer de cólon afeta igualmente homens e mulheres, sendo uma doença tratável e freqüentemente curável. O sistema imune é responsável pela defesa do organismo contra patógenos e alguns tumores, que desencadeiam uma resposta imune específica na tentativa de suprimir seu crescimento. Associado à atuação dos macrófagos, o consumo de produtos derivados da soja está sendo muito difundido atualmente, podendo diminuir o risco de determinadas doenças, inclusive dos tumores, melhorando as condições de saúde. As bactérias ácido lácticas são utilizadas em alimentos probióticos e são capazes de promover uma estimulação do sistema imune, influenciando através do aumento da fagocitose de patógenos e também quanto à produção de citocinas. Neste trabalho, avaliou-se a resposta imune no desenvolvimento de câncer de cólon induzido quimicamente com 1,2 dimetilhidrazina em ratos que receberam produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416, os quais foram suplementados ou não com cálcio. Os animais com e sem tumores receberam o produto fermentado de soja ou o produto fermentado de soja suplementado com cálcio. Aos controles não foi administrado o produto fermentado de soja ou suplementado. Estes grupos tiveram a atividade imunológica avaliada através da produção de mediadores como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO), interleucina (IL)-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, produzidos pelos macrófagos, e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-4 produzidos pelas células esplênicas. Os resultados demonstram que com a presença do tumor e produto fermentado há maior estimulação do sistema imune observado pela maior produção de  $H_2O_2$ , assim como os animais sem tumor e que receberam tratamento. Nos animais com tumores e que

receberam tanto o tratamento com o produto fermentado de soja como suplementado com cálcio observou-se menor produção de NO e IL-6, resultado este inverso ao observado nos grupos de animais saudáveis que receberam tratamento. Em relação a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  observamos produção em todos os grupos testados, sem nenhuma influência do tratamento recebido. Quanto à produção de IFN- $\gamma$  observamos que a maior concentração ocorreu nos animais com tumor que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, ou seja, mesmo na presença do tumor esses animais conseguiram apresentar uma resposta preferencialmente tipo Th1. Quanto à IL-4 observamos que o tratamento com o produto fermentado de soja induziu maior produção desta citocina no animal portador do tumor, demonstrando uma participação de resposta Th2. Deste modo, a partir de análises de correlação, sugerimos que o produto fermentado de soja suplementado com cálcio seria o melhor tratamento apresentando a resposta Th1 mais efetiva na contenção do tumor.

▪ **PALAVRAS-CHAVE:** câncer de cólon, macrófagos, produtos de soja, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, citocinas.

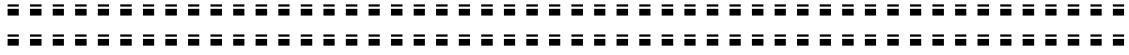
**ABSTRACT**

Cancer is the main problem of health and in the last years Brazil had a considerable progress in the mortality rate for cancer. Colon cancer affects men and women equally, and it is a treatable and frequently curable disease. Immune system is responsible for the organism defense against pathogenic substances and some tumors that unchain a specific immune response in the attempt of suppressing its growth. Combined the macrophages performance, the consumption of products derived from soy is being very spread now, could reduce the risk certain diseases, including tumors, improving health condition. Lactic acid bacteria is utilized in probiotic food and can promote a stimulation of immune system influencing through the increase of the pathogen phagocytosis and also the cytokines production. In this work, the immune response was evaluated in the development of colon cancer induced chemically with 1,2 dimethylhydrazine in rats that received soy product fermented with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416; which were supplemented or not with calcium. Animals with or without tumors that received the fermented soy product or the fermented soy product supplemented with calcium and to controls groups that didn't receive the fermented soy product or supplement with calcium. In these groups the immunological activity was evaluated through production of mediators such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumoral necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and IL-6, produced by macrophages, and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and IL-4, produced by spleen cells. Results demonstrate that in tumor presence and fermented product there is a higher immune system stimulation observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, as well as the animals without tumor and that received soy treatment. In the animals with tumors that received the fermented soy product treatment and supplemented with calcium was observed smaller production of NO and IL-6, this result

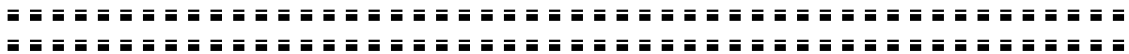
was inverse to the observed in the healthy groups of animals that received treatment. In relation to IL-1 $\beta$ , we observed production in all tested groups, with no influence of treatment received. In relation to TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  we observed that the highest production was in the animals with tumor that received the fermented product supplemented with calcium, so, even in presence of the tumor those animals present a Th1 response. As for IL-4, we observed that treatment with soy fermented product induced a higher production of this cytokine in the animal with tumor, demonstrating a Th2 response. So, through correlation analyses, we suggested that soy fermented product supplemented with calcium would be the best treatment and, Th1 response becomes more effective in tumor contention.

▪ **KEY WORDS:** colon cancer, macrophages, soy product, hydrogen peroxide, nitric oxide, cytokines.

# Capítulo 1



# *1. Introdução*



## **1.1. PRODUTOS FERMENTADOS: IMPORTÂNCIA ATRAVÉS DOS TEMPOS**

Apesar da origem exata do iogurte ainda ser um mistério para os pesquisadores, a base de seu aparecimento encontra-se na antigüidade. O leite fermentado que deu origem ao iogurte da atualidade teve origem no Oriente, como prova o próprio nome (jugurt). Através das expedições, guerras e relações comerciais entre os fenícios e os egípcios e mais tarde, também através de gregos e romanos, este alimento, que hoje faz parte do nosso cotidiano, rapidamente se difundiu, conquistando uma posição privilegiada na dieta alimentar dos mais diversos povos (SCHREZENENMEIR e DEVRESE, 2001).

Uma teoria data do período neolítico, entre 5000 a 3500 a.C., quando pastores passaram a se alimentar com o leite de animais domesticados. Armazenado em marmidas de barro, o leite ficava exposto às altas temperaturas do deserto, fermentava e virava um tipo de iogurte (LEVY, 1998).

Outra idéia sobre a origem vem dos desertos da Turquia, onde o leite fresco era guardado em sacos feitos de pele de cabra. Transportados por camelos, os sacos em contato com o calor do corpo do animal favoreciam a multiplicação de bactérias ácidas e transformavam o leite em iogurte. Outras indicações dão conta de que o iogurte possa ter aparecido junto aos antigos povos nômades dos Balcãs e, também nas zonas de estepes da Ásia Central (HEWITT e BANCROFT, 1985).

No século II a.C., Galeno, célebre médico grego, relatou os benefícios deste alimento, realçando a sua maior digestibilidade comparativamente ao leite e o seu efeito benéfico e purificador no excesso de bile e nos problemas de estômago. Outro importante médico da antigüidade, Dioscórides, recomendou o iogurte como medicamento para o tratamento do fígado, do estômago, do sangue, da tuberculose,

como depurativo geral e contra as supurações (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001).

No século VII, em Damasco, surgiu um livro de medicina intitulado "Grande explicação do Poder dos Elementos e da Medicina". Nesta obra, sucessivamente complementada e atualizada por diversos médicos eruditos gregos, árabes e hindus, recomendava-se unanimemente o consumo de iogurte como calmante, refrescante e regulador intestinal. Gengis Khan, o célebre guerreiro e líder militar dos mongóis, alimentava o seu invencível exército com iogurte, tomado ao natural ou utilizado como conservante da carne ou de outros alimentos (SALMINEN et al., 1998).

Há milhares de anos se reconhece os efeitos benéficos dos produtos fermentados; Abraão atribuiu sua fecundidade e longevidade à ingestão de fermentado. No início do ano de 1500, o rei da França Francis I atribuiu à cura da sua debilidade intestinal ao consumo de leite fermentado (WATER et al., 1999).

O interesse científico pelos fermentados surgiu a partir da publicação do livro de Eli Metchnikoff, "The prolongation of life" (1921), no qual o autor associa um adequado estado de saúde com a implantação, no trato gastrintestinal, de determinadas bactérias lácticas, provenientes dos produtos fermentados; Metchnikoff propôs que o ácido láctico, produzido pelas bactérias, proporcionaria um meio desfavorável às bactérias patogênicas. Metchnikoff experimentou em si mesmo e associou a sua saúde à ingestão regular de leite fermentado com *Lactobacillus bulgaricus*.

O termo "probiótico" é uma palavra derivada do grego, significando "para a vida". Foi usado pela primeira vez por Lilly e Stillwell em 1965 para descrever "substâncias secretadas por um microorganismo que estimula o crescimento de outro".



Parker em 1974 foi o primeiro a usar o termo "probiótico" no sentido em que é atualmente utilizado, como "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal".

Em 1989, Fuller tentando melhorar a definição dada por Parker definiu "organismos vivos que ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da microbiota bacteriana intestinal do hospedeiro". Este conceito foi posteriormente ampliado e definido como "organismos vivos que quando ingeridos em determinado número exercem efeitos benéficos para a saúde" (FULLER, 1991).

Para ser considerado um probiótico, os microorganismos devem ter as seguintes características: ser habitante normal do trato intestinal do hospedeiro, resistir às condições estressantes do trato intestinal e às instabilidades do meio ambiente; exercer efeitos benéficos no hospedeiro; estar viável nos alimentos e formulações terapêuticas; reproduzir-se rapidamente; produzir substâncias antimicrobianas; resistirem ao tempo entre a fabricação, comercialização e ingestão do produto (SHAHANI e AYEBO, 1980).

Os gêneros de microorganismos mais conhecidos para composição de probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, os quais são extensamente usados como principais bactérias para a produção de iogurte. A administração de probióticos pode levar ao restabelecimento da microbiota intestinal a ótimos níveis, permitindo um ataque benéfico às paredes do intestino pelas bactérias e assim alterando as propriedades metabólicas e funcionais da microbiota entérica no hospedeiro (SIITONEM et al., 1990; GOPAL et al., 2001). Devido à característica metabólica destes microorganismos, e por crescerem bem no leite, os principais produtos probióticos são de origem lática.

Dentre os vários microorganismos usados como probióticos, encontramos as bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias não ácido lácticas e leveduras (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002). Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores e na inibição da carcinogênese.

A designação BAL se aplica a um grupo de bactérias Gram-positivas, não patogênicas, que têm o ácido láctico como produto metabólico principal e que são tradicionalmente usadas na fermentação de alimentos. Nestas bactérias estão incluídos os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Os gêneros *Bifidobacterium* e *Enterococcus* também estão incluídos neste grupo no que diz respeito a bactérias inoculadas com finalidade funcional (GOLDBERG, 1994).

As bactérias do gênero Lactobacilos, também produtoras de ácido láctico, são uma das espécies bacterianas dominantes no intestino delgado e interferem em reações metabólicas que ocorrem nessa parte do trato gastrointestinal (RAFTER, 2003). São bactérias Gram-positivas aeróbias facultativas que convertem lactose e outros açúcares simples em ácido láctico. A produção de ácido láctico faz com que o ambiente fique ácido, o que inibe o crescimento de bactérias nocivas (FIGUEIREDO e PASSOS, 2003).

Os estudos estão sendo conduzidos para se verificar os benefícios que as próprias bactérias proporcionam, assim como os produtos alimentícios que as mesmas produzem. Normalmente os alimentos pesquisados são produtos a base de leite, incluindo leites fermentados, manteiga e leites não fermentados com culturas adicionadas. Cepas de *Lactobacillus acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium* são consideradas dentro da categoria de probióticas e utilizadas para suplementar culturas

tradicionais de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* (GOLDBERG, 1994).

As BAL também produzem metabólitos de atividade antibiótica que reduzem a quantidade de bactérias patogênicas, como o ácido láctico, causando um efeito positivo na diminuição e severidade das diarreias (SEDAS et al., 1996). O *L. delbrueckii ssp bulgaricus* produz a bulgaricina e o *S. thermophilus* produz a nicina e a diplococina. Estas substâncias apresentam atividade inibitória tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas, como a *Salmonella spp.*, *E. coli* e *Staphylococcus sp.* (SABOYA et al., 1997; SEDAS et al., 1996).

Os mecanismos produzidos pelas bactérias lácticas que levam à redução dos níveis de colesterol, não foram ainda elucidados. Existem hipóteses indicando a ação de certas bactérias sobre a desconjugação dos sais biliares: a baixa solubilidade dos sais biliares ou desconjugados provoca a co-precipitação do colesterol e com isso o mesmo não é reabsorvido no intestino. Desta forma, o fígado precisa retirar o colesterol da circulação sanguínea para a síntese de sais biliares (TOMERA, 1996; WATER et al., 1999).

Os metabólitos da desconjugação dos sais biliares são citotóxicos e estão relacionados com o aumento do risco do câncer de cólon (SANDERS, 2000). A maior desconjugação destes sais parece estar relacionada com a cultura viva, a qual precisa sobreviver ao suco gástrico e chegar ao intestino. Sabe-se que as bactérias *L. delbrueckii ssp bulgaricus* e *S. thermophilus*, não fazem parte da microbiota intestinal, embora alguns estudos indiquem que o *S. thermophilus* resiste ao suco gástrico e adere pobremente na mucosa intestinal (CONWAY et al., 1987).

Tradicionalmente os *Enterococcus* são considerados bactérias lácticas (HOLZAPFEL e WOOD, 1995). Assim como outras BAL, os *Enterococcus* estão

presentes em um grande número de produtos lácteos como culturas iniciadoras, em suplementos alimentares e alimentos considerados funcionais. São cocos Gram-positivos que freqüentemente ocorrem aos pares (diplococos), sendo organismos anaeróbicos facultativos (FISCHETTI, 2000). Os *Enterococcus* são utilizados no processo de fermentação ou para melhoria da qualidade sensorial de alimentos, e como probióticos alimentares. A primeira descrição do gênero *Enterococcus* data de 1984 quando Schleifer e Kilpper-Bälz descreveram o *E. faecium* e *E. faecalis* (KLEIN, 2003).

O iogurte é um dos alimentos mais conhecidos que contém probióticos. É definido pelo *Codex Alimentarius* de 1992 como um produto coagulado do leite que resulta da fermentação de ácido láctico por *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (MEYDANI e HA, 2000).

A constituição do iogurte é baseada na composição nutricional do leite do qual é derivado, sendo afetado por muitos fatores, como diferenças individuais e genéticas dos mamíferos, alimentação, fase de lactação, idade e fatores ambientais, como a estação do ano. Outras variáveis que exercem um papel durante o processamento do leite, incluindo a temperatura, duração de exposição ao calor, exposição à luz e condições de armazenamento, também afetam o valor nutricional do produto final. Além disso, as mudanças em componentes de leite que acontecem durante a fermentação ácida láctica influenciam no valor nutricional e fisiológico do produto final (ADOLFSSON et al., 2004).

Alimentos funcionais podem ser definidos como "alimentos semelhantes em aparência aos alimentos convencionais, consumidos como parte da dieta, que produzem benefício específico à saúde, além de satisfazer os requerimentos nutricionais" ou "alimentos, em forma natural ou processada, que contêm níveis significantes de

componentes biologicamente ativos que, além da nutrição básica, trazem benefícios à saúde, à capacidade física e ao estado mental" (HEWITT e BANCROFT, 1985).

Recentemente, muitos dos probióticos são suplementados de prebióticos, num único produto e são considerados simbióticos. A premissa é a de que o prebiótico selecionado seja um substrato metabolizável pelo microrganismo probiótico no intestino. Isto possibilitaria um aumento na capacidade de sobrevivência do probiótico (COLLINS e GIBSON, 1999).

Prebióticos são "moléculas não digeríveis que atuam de forma benéfica no hospedeiro, estimulando o crescimento e/ou a atividade de um número limitado de bactérias do cólon, podendo melhorar a saúde do hospedeiro". Alguns tipos de fibras alimentares, ou seja, carboidratos os quais não podem ser digeridos pelo nosso corpo (ditos oligossacarídeos), exceto através da atividade bacteriana, são ditos prebióticos. Através do aproveitamento desses oligossacarídeos, os microrganismos probióticos produzem mais ácidos graxos de cadeia curta que baixam o pH dos intestinos, inibindo o desenvolvimento das bactérias patogênicas, ao mesmo tempo em que possibilitam que alguns minerais como o cálcio e o magnésio, se tornem mais solúveis e sejam melhor absorvidos pelo organismo (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

O iogurte de soja, considerado uma combinação de dois alimentos funcionais, é um alimento funcional obtido a partir do leite de soja fermentado por microorganismos vivos. A proteína de soja é considerada pela Organização Mundial de Saúde, como a única proteína vegetal de alto valor biológico, que contém todos os aminoácidos essenciais necessários para o crescimento e manutenção do organismo humano (BESHKOVA et al., 1998).

De acordo com a Resolução nº5, de 13 de Novembro de 2000, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA), o iogurte é um tipo de leite fermentado, cuja

fermentação se realiza com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido láticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2000).

A soja (*Glycine max*) constitui um produto de grande importância dentro da classe dos alimentos funcionais. O consumo da soja *in natura* ou mesmo processada na forma de derivados tem despertado interesse muito grande da população e, principalmente dos pesquisadores, não só por ser considerada uma fonte importante de nutrientes de baixo custo, mas particularmente pela sua capacidade de diminuir o risco de determinadas enfermidades crônicas, muitas vezes podendo ser indicada como coadjuvante dos processos terapêuticos tradicionais (ROSSI, 2001). É considerada um alimento de alto valor nutritivo e de grande importância na alimentação humana rica em proteína (30% a 45%) e em óleo (15% a 25%) (NIELSEN, 1985).

Esta leguminosa é cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos e no início do século XX passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos. No Brasil, o grão chegou em 1908, porém a expansão agrícola aconteceu nos anos 70 com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional (SOUZA et al., 2000). As características químicas e nutricionais da soja e seus derivados são fatores que a qualificam como um alimento funcional.

Além da qualidade de sua proteína, estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (SETCHELL e CASSIDY, 1999). Entre as substâncias presentes na soja responsáveis por esses efeitos, atualmente, as de maior interesse são as isoflavonas, particularmente a genistéina e daidzeína. Dessa forma, a

soja é um dos alimentos que oferece as maiores possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais (SOUZA et al., 2000). Dentre os alimentos produzidos a partir da soja destacam-se principalmente: tofu, leite de soja, iogurte de soja, carne de soja e farinha de soja.

O iogurte de soja apesar de apresentar características nutricionais semelhantes aos produtos fermentados de leite, difere significativamente destes em relação ao conteúdo mineral, sendo relativamente deficiente em cálcio. A adição de cálcio ao iogurte de soja na forma de citrato, carbonato, fosfato, gliconato ou lactato, apesar de provocar alterações na acidez titulável, viscosidade e consistência, não conferiram propriedades sensoriais indesejáveis ao produto. Verificou-se que o tempo de fermentação não excedeu aquele de processos industriais convencionais. Dessa forma, todos os sais testados se mostraram viáveis para o processo de enriquecimento desse produto (UMBELINO et al., 2001).

Micronutrientes como vitaminas e minerais podem potencializar alguns destes processos da imunidade não específica pela modulação da função celular inflamatória (ERICKSON et al., 2000).

Sais minerais e vitaminas funcionam como "co-fatores" do metabolismo no organismo. Sem eles as reações metabólicas ficariam tão lentas que não seriam efetivas. Os sais minerais desempenham funções vitais em nosso corpo mantendo o equilíbrio de fluidos, controlando a contração muscular, carregando oxigênio para a musculatura e regulando o metabolismo energético (IULIANO-BURNS et al., 2006).

Produtos de consumo diário geralmente são considerados uma fonte excelente de proteína de alta qualidade por conterem sais minerais como cálcio, potássio, fósforo, magnésio e zinco e, vitaminas do complexo B, como riboflavina, niacina, vitamina B-6 e vitamina B-12. Embora presentes na dieta, alguns minerais nem sempre são ingeridos

nas quantidades suficientes para satisfazer as necessidades metabólicas, especialmente durante a fase de crescimento, estresse, trauma, perda de sangue e algumas doenças (BUTTRISS, 1997).

O corpo do homem adulto contém aproximadamente 1000 a 1500 g de cálcio (dependendo do gênero, raça e tamanho do corpo) dos quais 90% são encontrados nos ossos na forma de hidroxapatita (DELMAS, 2002). A necessidade diária pode ser obtida pela ingestão de alimentos enriquecidos com cálcio, suplementos farmacológicos ou ambos. Embora a soja seja rica em oxalato e ftalato, produtos à base de soja têm relativamente alta quantidade de cálcio disponível, equivalente à do leite (FISHBEIN, 2004).

Os produtos lácteos constituem uma das melhores fontes de cálcio, um nutriente essencial que pode prevenir a osteoporose e possivelmente o câncer de cólon (SANDERS, 1994). As principais fontes de cálcio além dos laticínios (leite, iogurte e queijos), são peixes ósseos, legumes, brócolis e repolho. Muitos trabalhos contribuem para a teoria de que a suplementação de cálcio na alimentação pode também prevenir o desenvolvimento do câncer de cólon. Vários estudos epidemiológicos evidenciam que regiões onde o consumo de cálcio é grande há um baixo índice de câncer de cólon (HOLT, 1999).

Uma das hipóteses do mecanismo de ação do cálcio é sua ligação com os ácidos biliares. Ácidos biliares, produzidos durante a digestão de gordura, provocam irritabilidade nas células epiteliais do cólon. Dessa forma, o cálcio se combina com esses ácidos, formando compostos insolúveis que neutralizarão essa capacidade de irritar o epitélio do cólon e assim induzir um aumento nas taxas de proliferação. Sem o aumento da proliferação celular, a probabilidade das células progredirem para neoplasia ou câncer estaria diminuída (NEWMARK e WARGOVICH, 1986).



As necessidades de cálcio são geralmente supridas por laticínios, especialmente leite. A maior parte do cálcio (90%) é armazenada nos ossos, como já mencionado, com uma troca constante ocorrendo com o sangue, tecidos e ossos. Além de ser fundamental para o fortalecimento de ossos e dentes, o cálcio também é necessário para o funcionamento adequado do sistema nervoso e imunológico, contração muscular, coagulação sanguínea e pressão arterial (LIN et al., 2005).

## **1.2. O CÂNCER E O SISTEMA IMUNE**

O câncer é o principal problema mundial de saúde e uma das causas mais importante de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. Nos últimos anos, o Brasil obteve um avanço considerável no índice de mortalidade por câncer e a cada ano, se configura e se consolida como um problema de saúde pública de dimensões nacionais (KLIGERMAN, 2002).

Dentre os tipos de câncer, o de colo-retal é o segundo tumor maligno mais comum nos Estados Unidos, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão (WEIR et al., 2003). Tanto homens como mulheres são igualmente afetados, sendo uma doença tratável e freqüentemente curável. Estimativas de incidência de câncer no Brasil para 2006, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), apontam o câncer de colo-retal como o quinto tumor maligno mais freqüente entre homens e quarto entre as mulheres (BRASIL, 2005).

A maior incidência de casos de câncer de cólon ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento já aumentam a partir de 40 anos. A heterogeneidade na ocorrência mundial nos índices de câncer de cólon é geralmente devido a diferentes hábitos alimentares das populações (DOLL e PETO, 1981). Dietas

ricas em carne vermelha, gordura e pobres em fibras estão associadas com o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (GIOVANNUCCI e WILLETT, 1994). Estes fatos constituem os principais fatores de risco para o câncer de colo-retal. Isso implica que a ingestão de dietas suplementadas com cálcio, ricas em fibras e pobres em gordura reduz o risco de desenvolvimento de adenoma colo-retal (BARON et al., 1999).

Na maioria dos casos, quando detectado em seu estágio inicial, o câncer de cólon é curável, embora nesta fase, dificilmente apresente sintomas. Como todos os outros tecidos e órgãos do corpo, o cólon é constituído por células que se dividem e se reproduzem de forma ordenada e controlada. Quando ocorre alguma disfunção celular que altera este processo, é produzido um excesso de tecido que dá origem ao tumor, o qual pode ser benigno ou maligno. O tumor maligno, ou câncer, cresce, não apenas comprimindo, mas também, invadindo e destruindo tecidos saudáveis à sua volta (KROK e LICHTENSTEIN, 2004).

O desenvolvimento deste tipo de câncer está relacionado a sinais como mudança injustificada de hábito intestinal, diarreia ou prisão de ventre recorrente, sangue nas fezes, evacuações dolorosas, constante flatulência (gases), desconforto gástrico (sensação de plenitude estomacal, contrações dolorosas), sensação de constipação intestinal, perdas injustificadas de peso e cansaço constante. No entanto, a presença de um ou mais destes sintomas não significa, necessariamente, que o câncer esteja presente, os quais podem ser causados por diversas doenças gastrintestinais, como úlceras ou inflamação do cólon (ITZKOWITZ e HAPRAZ, 2004).

Atualmente, sabe-se que além dos efeitos favoráveis contra doenças causadas por desequilíbrio da microbiota intestinal, as BAL desempenham um importante papel no retardamento da carcinogênese do cólon por influenciar as funções metabólicas, imunológicas e protetoras no cólon (SANDERS, 1994; ROBERFROID et al., 1995).

Uma microbiota entérica equilibrada ou "normal" pode competitivamente excluir possíveis organismos patogênicos e estimular o sistema imune intestinal (BENGMARK, 2000; DE ROOS e KATAN, 2000).

O potencial benéfico da ingestão de probióticos também pode ser esperado em outros campos importantes como modulação dos níveis de colesterol, exclusão competitiva de patógenos intestinais, redução dos sinais e sintomas de intolerância à lactose, redução de atividades de enzimas bacterianas, estimulação do sistema imune e prevenção de câncer (SANDERS, 2003).

Os mecanismos precisos de como as bactérias lácticas podem inibir o câncer de cólon são ainda desconhecidos. Tais mecanismos podem incluir alterações da atividade metabólica na microbiota intestinal e das condições químicas no cólon, ligação e degradação de carcinógenos potenciais, alteração quanti- e qualitativa na microbiota intestinal, produção da anti-tumorigênese ou anti-mutagênese (RAFTER, 2003). Várias cepas de bactérias lácticas com capacidade de redução do colesterol já foram testadas e, dentre elas, a associação entre *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 mostrou-se viável, tecnológica e sensorialmente, na obtenção de um produto com característica hipocolesterolêmica (ROSSI et al., 1999, 2000, 2001, 2003).

O produto fermentado por bactérias lácticas resposta imune adaptativa, inata ou ambas (PERDIGON et al., 2001; VENDRAMINI, 2002). A resposta imunológica constitui uma ampla área de mecanismos de defesa, desde a prevenção e combate à infecção, até a identificação e eliminação de células anormais, as quais podem originar neoplasias.

O sistema imunológico pode ser dividido em componentes inato e adaptativo, com extensa interligação entre os dois. A resposta inata inclui fatores solúveis, como

proteínas do complemento e várias células efectoras, inclusive granulócitos, mastócitos, macrófagos, células dendríticas (DC) e "natural killer" (NK). A imunidade inata serve como a primeira linha de defesa contra infecção (JANEWAY, 2001).

Perdigon et al. (1988) investigaram os efeitos do leite fermentado com *L. casei* e *L. acidophilus* nos mecanismos de defesa em camundongos por oito dias consecutivos e observaram que ambas as bactérias lácticas aumentaram significativamente as atividades fagocítica e enzimática de macrófagos peritoneais desses camundongos.

Os macrófagos são células que apresentam a capacidade de fagocitar microorganismos e partículas estranhas num mecanismo primário de defesa. Subseqüentemente, liberam inúmeros mediadores ao meio externo, numa tentativa de controlar uma resposta indesejável ao organismo hospedeiro. Uma importante função dos macrófagos observada em relação aos efeitos dos micronutrientes é a produção de citocinas como interleucina (IL)-1 e IL-6, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), mediador de inflamação como prostaglandina-E2 (PG-E2) e intermediários reativos do nitrogênio e oxigênio. Além da fagocitose e produção de citocinas, os macrófagos podem apresentar antígenos em conjunto com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II em sua superfície (ESKEW et al., 1989).

O estado de ativação dos macrófagos, que participam da homeostase ou de processos patológicos, pode ser determinado através de vários sinais incluindo a matriz extracelular, macromoléculas externas e células estranhas ao organismo. Esse estado de ativação tanto *in vivo* como *in vitro*, pode ser influenciado através de alterações de vários componentes dietéticos. Enquanto um foco principal de estudos dietéticos tem sido relacionado com a função dos macrófagos e macronutrientes, por exemplo, gordura dietética, vários outros focalizam os efeitos de micronutrientes como as vitaminas.

Esses estudos confirmaram que micronutrientes podem alterar significativamente a função dos macrófagos e assim alterar o seu papel na imunidade inata, inflamação e vários processos de doença (ERICKSON et al., 2000).

Metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio têm sido sugeridos como importantes moléculas sinalizadoras em reações intra e intercelulares em diferentes tipos de células. É conhecido que espécies reativas tais como o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) e peroxinitrito ( $\text{OONO}$ ) são produzidos para ativar células do processo inflamatório (ROCHELLE et al., 1998).

A geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  representa um processo celular natural, resultante de várias reações essenciais à atividade celular, no entanto, a liberação de altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induz a quebra de fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana levando à morte celular (NELSON e COX, 2004). Sob condições fisiológicas normais, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é gerado em pequenas quantidades e é rapidamente utilizado ou degradado. Atualmente, está claro que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é usado não somente como substrato para peroxidases, mas também para oxidação de grupamentos tióis nas proteínas. A utilização de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na regulação celular constitui um fato de pequena magnitude quando comparado seu grande potencial em modificar proteínas e, conseqüentemente, modular suas atividades (RAMASARMA, 1990).

A maior parte do oxigênio consumido é convertida em  $\text{H}_2\text{O}_2$  por dismutação espontânea do  $\text{O}_2$ , ou pela ação da superóxido dismutase (SOD) (HAMPTON e ORRENIUS, 1998). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem atividade bactericida somente em altas concentrações (HYSLOP et al., 1995). Dessa forma, a ação microbicida dos fagócitos, provavelmente, é devida à ação de oxidantes secundários, produzidos a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e do  $\text{O}_2^-$  (HAMPTON e ORRENIUS, 1998).

Está bem estabelecido que os níveis basais das Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) são mais altos em processos malignos quando comparados a células normais (SZATROWSKI e NATHAN, 1991; TOYOKUNI et al., 1995). Elevadas concentrações de ERO em tumores também podem ser resultado de atividades anti-cancerígenas de células imunes e citocinas citotóxicas (BROWN e BICKNELL, 2001).

Níveis intracelulares excessivos de ERO também são uma consequência da ação de várias terapias anti-câncer como radioterapia, hipertermia e quimioterapia. Para isto mostrou-se recentemente que as ERO desempenham importante papel na ação citotóxica de camptotecina, um inibidor de topoisomerase, enzima usada no tratamento de câncer colo-retal avançado (GARCIA-CARBONERO e SUPKO, 2002).

As Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN), especialmente o NO, representam um importante mediador da atividade microbicida e anti-tumoral dos macrófagos (XIE et al., 1995), contribuindo para a resposta inespecífica do hospedeiro e para o processo inflamatório. O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (MORRIS e BILLIAR, 1994), sendo um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (BECKMAN e KOPPENOL, 1996).

O NO está envolvido em numerosos processos homeostáticos como regulação do tônus vascular, modulação da citotoxicidade por macrófagos ativados, regulação da proliferação celular, regulação da migração celular, ativação de fatores de transcrição, indução de genes citoprotetores, modulação da produção de citocinas tóxicas e neurotransmissão central e periférica (FELLSTRÖN e ZEZINA, 2001). Esse metabólito participa de muitos processos fisiológicos relacionados aos sistemas nervoso central (CHRISTOPHERSON e BREDT, 1997) e periférico (QUEIROZ e BATISTA, 1999; THOMPSON et al., 1998) e desempenha um importante papel no controle de muitas

infecções, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Todavia, o descontrole na síntese de NO está implicado na patogênese de doenças cardiovasculares, auto imunidade, rejeição de transplantes, sepse (NATHAN, 1992), doenças cerebrais degenerativas (HALLIWELL, 2001), indução de câncer (SCHMIDT e WALTER, 1994), genotoxicidade (WINK et al., 1998) e na inflamação (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

O NO também apresenta ação anti-tumoral (JENKINS et al., 1995; MURTA et al., 1999). Entretanto, essa atividade anti-tumoral depende da quantidade de NO gerada e da interação das células do hospedeiro com as do tumor. Esta interação pode gerar efeito ora estimulante ora inibitório na imunidade anti-tumoral (O'SSULLIVAN e LEWIS, 1994; MURTA et al., 1999). Portanto, a diversidade dos efeitos do NO parece estar relacionada às concentrações de NO gerados, a sensibilidade individual das células e à duração do fenômeno (THOMSEN et al., 1995; QUEIROZ e BATISTA, 1999).

O NO assume particular importância na neovascularização, contribuindo para manutenção do fluxo sanguíneo adequado ao tumor (BUTTERY et al., 1993). A indução da síntese de NO está no contexto das defesas do organismo contra infecções, inflamações e muitas neoplasias, contudo, dependendo das quantidades geradas, pode levar à morte celular e danos teciduais (MONCADA et al., 1991; MONCADA e HIGGS, 1993; NATHAN e XIE, 1994; WINK et al., 1998).

O NO é sintetizado por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintetase (NOS), que converte a L-arginina em NO e L-citrulina. Três isoenzimas foram identificadas como responsáveis pela produção de NO e foram denominadas de neuronal (nNOS ou NOS 1), induzível (iNOS ou NOS 2) e endotelial (eNOS ou NOS 3). A iNOS foi originalmente purificada e clonada a partir de macrófagos ativados, embora células musculares cardíacas, células de músculo liso vascular e células da glia

também produzem NO a partir da iNOS (LOPES-FARRÉ et al., 1998; SARIH et al., 1993).

A iNOS é expressa em estímulos patológicos, como microorganismos invasores. Sua indução é estimulada por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos e algumas citocinas sintetizadas em resposta aos LPS, incluindo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 (NATHAN, 1992).

A imunomodulação por probióticos através da produção de citocinas tem sido intensivamente investigada nos últimos anos em células primárias e em linhagens de roedores e humanos (NICAISE et al., 1993; MIETTIENEN et al., 1996; VENDRAMINI, 2002).

As citocinas constituem um grupo de glicoproteínas solúveis e peptídeos de baixo peso molecular. Atuam mediando interações entre células e tecidos (DUNLOP e CAMPBELL, 2000). São mediadores solúveis liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário, essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Elas também modulam a inflamação e a imunidade regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994). A produção das citocinas ocorre em resposta a diversos estímulos celulares, incluindo o dano induzido por carcinógenos, infecção e inflamação (DRANOFF, 2004).

As interleucinas (IL) foram originalmente descritas como produtos de monócitos e linfócitos, mas muitas células não-hematopoiéticas como fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e astrócitos são capazes de produzir algumas ILs. (DUNLOP e CAMPBELL, 2000).

Quando uma resposta inflamatória aguda é ativada, a seqüência de citocinas pró-inflamatórias inicia-se com a produção imediata de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Estes estimulam a liberação de IL-6, que realiza um importante papel iniciando a reação hepática de fase



aguda (LUSTER et al., 1994). Esses efeitos relacionam-se com a febre, trombocitose, caquexia e modificação dos componentes protéicos. IL-6 também pode estar envolvida na transformação maligna e progressão tumoral (TSUKAMOTO et al., 1992) e é uma citocina sintetizada por macrófagos e outras células em resposta a microorganismos e a outras citocinas, atuando sobre células T, B e macrófagos (SYK et al., 2002).

A IL-1 $\beta$  é sintetizada em células imunes infiltradas por tumores como também células endoteliais. Sua principal função é observada na regulação da proliferação e diferenciação de células imunes normais e malignas como também outros tipos de células. Alguns pesquisadores demonstraram que a IL-1 $\beta$  induz expressão de fatores angiogênicos potentes, fator de crescimento endotelial vascular e a produção de IL-8 em células de câncer de cólon humanas (ABDUL e HOOSEIN, 2002; LIU et al., 2003).

Ao mesmo tempo, a resposta antiinflamatória inicia com a produção de receptor de IL-1, receptor solúvel de TNF- $\alpha$  e IL-10. Isto reduz os níveis e atividade de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Dependendo do estímulo físico, outras citocinas como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento e transformação-beta (TGF- $\beta$ ) são produzidos e desempenham um papel no processo de remodelação do tecido (KELLY, 1990; RUBIN et al. 1995).

O TNF- $\alpha$  é uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias, atuando no início da resposta imune e regulando a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória. Também está envolvido em eventos locais e sistêmicos, contínuos à inflamação (MARKHATADZE, 1998). É uma citocina que possui importantes efeitos biológicos em uma variedade de células, efeitos esses na maioria relacionados a processos imunomodulatórios e inflamatórios (CASALE et al., 1996).

O TNF- $\alpha$  é produzido por muitas células ativadas incluindo monócitos, macrófagos, granulócitos, linfócitos T e B, células NK, queratinócitos, fibroblastos e

algumas células tumorais (BEYAERT e FIERS, 1998). Entretanto quando se encontra em altos níveis pode induzir a morte celular por apoptose (SCREATON e XU, 2000).

No câncer de cólon, o antígeno carcinoembrionário (CEA) é produzido por células cancerígenas. Quando CEA alcança o fígado, liga-se a receptores das células de Kupffer, estimulando a produção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Estas citocinas também aumentam a adesão de células de câncer de cólon ao endotélio (GANGOPADHYAY et al., 1996).

Os mecanismos pelos quais o produto fermentado pode inibir o crescimento de tumor experimental são provavelmente devido a uma diminuição da resposta inflamatória induzida pelo carcinógeno, aumento de IgA, aumento da apoptose celular e aumento da taxa de TNF- $\alpha$ . A cultura do iogurte inibe o crescimento do carcinoma intestinal em ratos, aumentando a atividade de IgA, linfócitos T e macrófagos (PERDIGON et al., 2001).

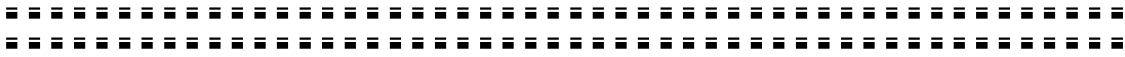
Além dos macrófagos serem potentes células secretoras de citocinas, os linfócitos T compartilham essa atividade. Células T são freqüentemente classificadas em 2 categorias, tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) (MOSMANN et al., 1986). Células Th1 são as principais produtoras de IFN- $\gamma$  e IL-2 e participam da imunidade mediada por células enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e participam da imunidade humoral.

IFN - $\gamma$  possui um papel crítico na indução de outras citocinas e ativação da morte natural de células. Vários estudos indicaram que o consumo de iogurte ou ingestão de BAL modula a produção de várias citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IFN - $\gamma$  e TNF - $\alpha$  (HALPERN et al., 1991; MIETTINEMET al., 1996; SOLIS-PEREYRA et al., 1997; BORRUEL et al., 2002; VENDRAMINI, 2002). De Simone et

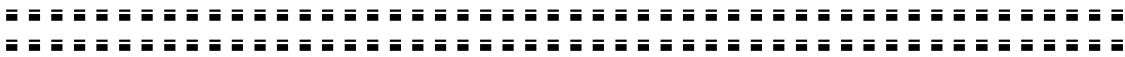
al. (1986), observaram que a produção de IFN- $\gamma$  *in vitro* usando linfócitos humanos é maior nas culturas com a presença de BAL que na ausência deste.

O TNF- $\alpha$  atua em sinergismo com o IFN- $\gamma$  na ativação macrofágica, especialmente na produção de NO (JANEWAY, 2001). Dentre as citocinas, o IFN- $\gamma$  é uma proteína homodimérica produzida por células NK, células Th1 CD4+ e células T CD8+. O IFN- $\gamma$  é a citocina liberada pelos linfócitos T e células NK que ativa o macrófago, destruindo microorganismos fagocitados, estimulando a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, radicais de oxigênio e NO, estimulando a destruição dos microorganismos fagocitados (JANEWAY e TRAVERS, 1997).

A IL-4 é uma potente citocina multifuncional produzida por células T ativadas, mastócitos e basófilos. Pode estimular o crescimento, diferenciação e manutenção da viabilidade das células T e B. Essa citocina possui uma grande variedade de efeitos biológicos em muitas células não linfóides, incluindo as células endoteliais e fibroblastos (PAUL, 1991). Encontra-se diretamente relacionada à ativação de células Th2, influenciando a resposta humoral.



## *2. Objetivos*



## **2.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a resposta imune no desenvolvimento de câncer de cólon induzido quimicamente com 1,2 dimetilhidrazina (DMH) em ratos que receberam produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416., suplementados ou não com cálcio.

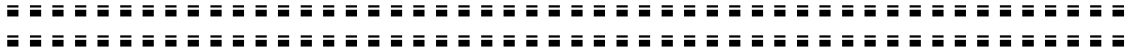
## **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

2.2.1. Avaliar a viabilidade celular dos macrófagos utilizando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (MTT);

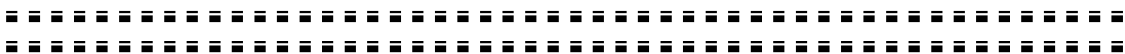
2.2.2. Quantificar os intermediários reativos do nitrogênio (NO) e oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em culturas de macrófagos peritoneais de ratos;

2.2.3. Determinar as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em culturas de macrófagos peritoneais;

2.2.4. Determinar as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 em culturas de células esplênicas.

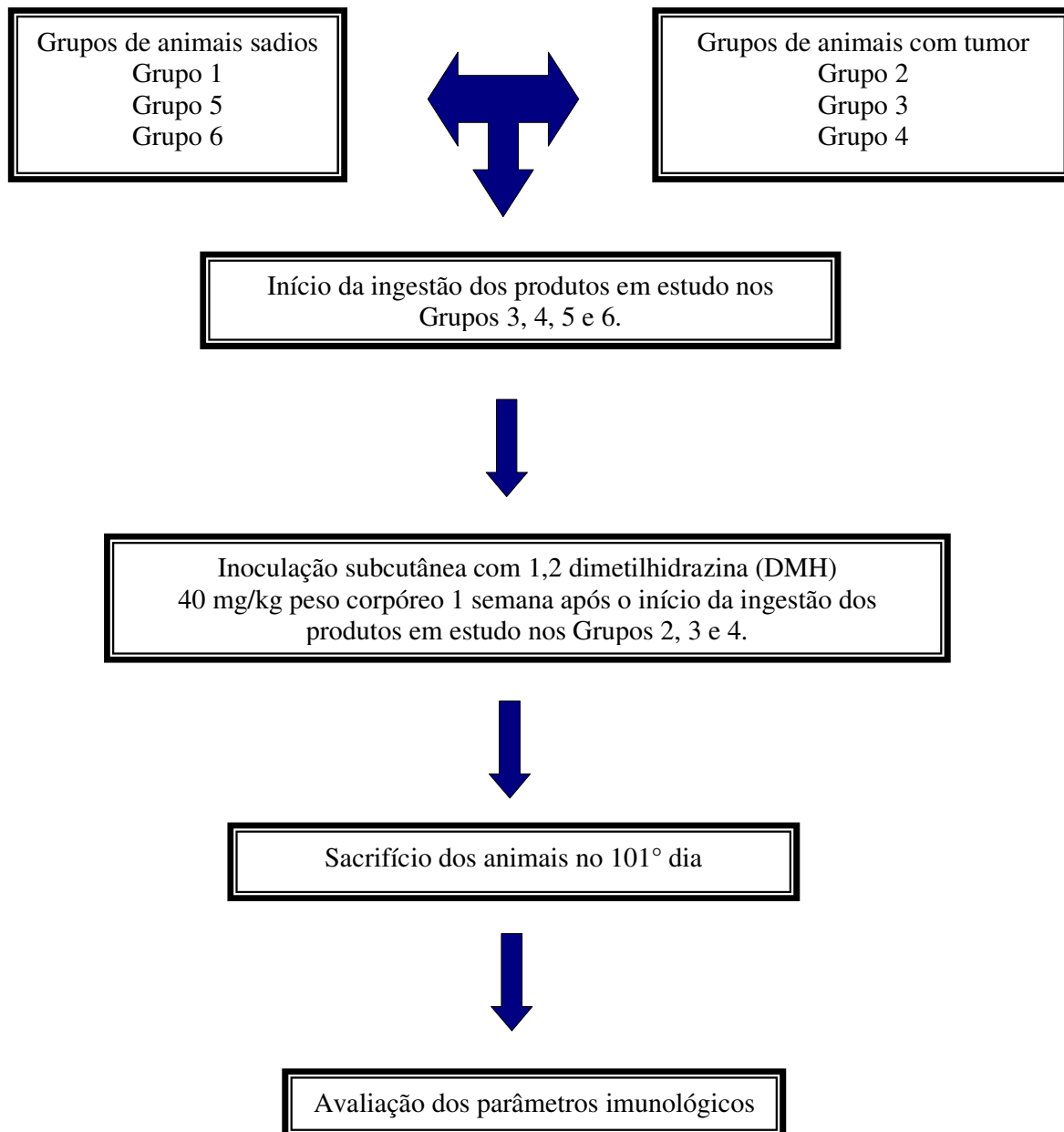


### *3. Materiais e Métodos*

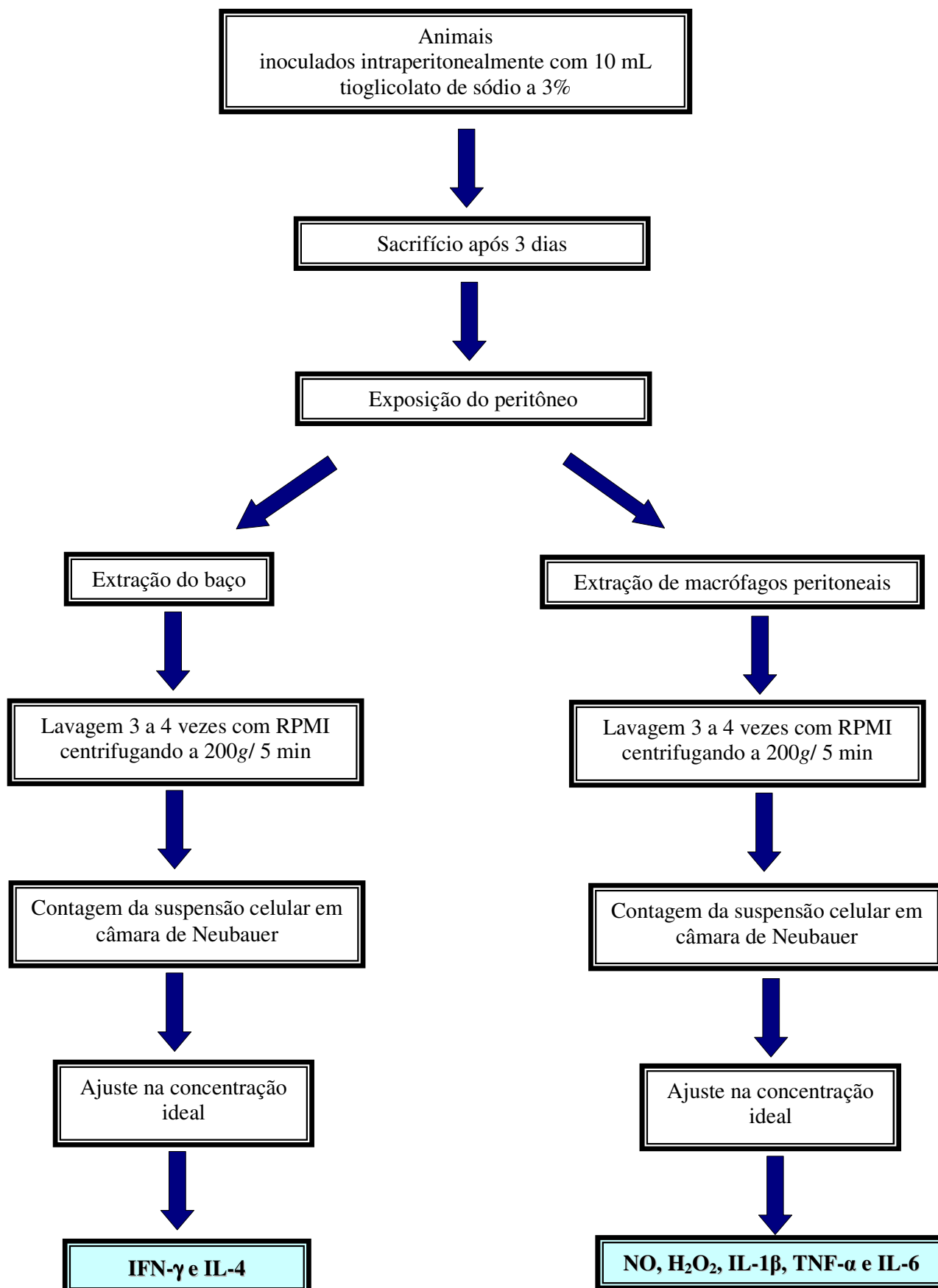


### 3.1. FLUXOGRAMA

#### 3.1.1. INDUÇÃO QUÍMICA DO TUMOR



### 3.1.2. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DO EXSUDATO PERITONEAL





## **3.2. OBTENÇÃO DOS PRODUTOS FERMENTADOS DE SOJA**

### **3.2.1. Produto Fermentado**

O produto de soja fermentado foi produzido a partir do "leite de soja" substituindo o inóculo bacteriano convencional (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) por 1,5% (v/v) de cultivo de *E. faecium* CRL 183 e 1,5% (v/v) de cultivo de *L. helveticus ssp jugurti* 416. A fermentação foi realizada a 37°C até o produto apresentar pH 4,5.

O "leite de soja" (matéria prima básica para a produção do produto fermentado) foi processado na Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja - UNISOJA, do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, de acordo com a metodologia descrita por Rossi, 2000.

### **3.2.2. Produto fermentado suplementado com cálcio**

Produzido a partir do "leite de soja" enriquecido com 600mg de cálcio/L (Merck, Brasil) na forma de fosfato tribásico de cálcio, conforme descrito por Umbelino et al. (2001).

## **3.3. ANIMAIS**

Em cada experimento foram utilizados 5 ratos machos, linhagem Wistar, adultos, com 11 semanas de idade, pesando aproximadamente 90 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, (UNESP), situado na cidade de Araraquara - SP. Os animais foram mantidos

em gaiolas metabólicas de policarbonato, com água e ração (Purina) *ad libitum* em condições estáveis de ambiente ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 56% de umidade relativa do ar) com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas.

### **3.4. ADMINISTRAÇÃO DOS PRODUTOS DE SOJA**

Os produtos foram administrados aos animais por meio da técnica de gavagem, na quantidade de 3 mL/kg de peso/ dia, 1 vez por semana durante o período de 100 dias. Todos os procedimentos com animais foram conduzidos conforme parecer do Comitê de Ética local (parecer nº 46/2004).

### **3.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

Os animais foram distribuídos em 6 grupos experimentais, contendo 5 animais em cada grupo (n=30).

O Grupo 1 foi constituído de animais sadios que não receberam o produto fermentado (Controle negativo).

O Grupo 2 foi constituído de animais com câncer de cólon induzido quimicamente e que não receberam o produto fermentado (Controle positivo).

O Grupo 3 foi constituído de animais com câncer de cólon induzido quimicamente e que receberam o produto fermentado não suplementado com cálcio.

O Grupo 4 foi constituído de animais com câncer de cólon induzido quimicamente e que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio

O Grupo 5 foi constituído de animais sadios que receberam o produto fermentado não suplementado com cálcio.

O grupo 6 foi constituído de animais sadios que receberam o produto fermentado e suplementado com cálcio.

### **3.6. INDUÇÃO QUÍMICA DO CÂNCER DE CÓLON EM ANIMAIS**

Uma semana após o início da ingestão dos produtos em estudo, os animais dos Grupos 2, 3 e 4 foram inoculados subcutaneamente com 1,2 dimetilhidrazina (DMH), indutor químico de carcinogênese de colón, em dose única de 40mg/kg peso corpóreo (LI e LI, 2003). O carcinógeno DMH foi dissolvido em uma solução salina 0,9% e posteriormente ajustado a pH 6,5 com solução de hidróxido de sódio. Após quatro semanas da inoculação do carcinógeno DMH, os animais foram palpados semanalmente para se verificar o aparecimento do tumor (WEI et al., 2003).

### **3.7. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS**

Os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> a partir do 101º dia, para a coleta dos macrófagos peritoneais e das células esplênicas para posterior realização dos testes imunológicos.

### **3.8. OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO EXSUDATO PERITONEAL (PEC)**

Os animais foram previamente inoculados intraperitonealmente, com 10mL de tioglicolato de sódio (Difco, Alemanha) a 3%, três a quatro dias antes da coleta de células. Após este período, estes animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. O peritônio foi exposto em fluxo laminar horizontal Classe 100 (Veco, Brasil) para a

retirada do exsudato peritoneal. Na porção mediana superior do abdômen foi injetado 20mL de solução RPMI estéril em pH 7,2 e a 4°C, com o auxílio de seringa e agulha também estéreis. Uma leve massagem abdominal foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril (Corning, EUA) para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5mL de RPMI estéril (pH 7,2) e centrifugadas a 400xg por 5min. em centrífuga (Fanem, Brasil) à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma, Suíça) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma, EUA) a  $2 \times 10^{-5}M$ , penicilina (Sigma, EUA) 100U/mL, estreptomicina (Sigma, EUA) 100U/mL, L-glutamina (Sigma, EUA) 2mM e 5% de soro fetal bovino (Cutilab, Brasil), sendo o meio assim designado de RPMI-1640-completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha) com a utilização de 10μL da suspensão celular diluída em 90μL do Líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio. Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60min. em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA) para a aderência de macrófagos. As células não aderentes foram retiradas por lavagens com o meio de cultura RPMI-1640.

### **3.9. OBTENÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS DE BAÇO**

Para avaliar a ativação de linfócitos foram utilizadas culturas de células totais de baço. Os animais foram sacrificados em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco, Brasil), sendo os baços extraídos assepticamente e transportados para uma placa de Petri

estéril (Corning, EUA) contendo 3mL de RPMI (Sigma, Suíça), pH 7,2, gelado, onde foram macerados cuidadosamente com o auxílio de pinças estéreis para liberação das células. O conteúdo da placa foi aspirado várias vezes por seringa de 3mL e agulha 25 x 7,0mm para obtenção de uma suspensão celular homogênea. Após este procedimento, as células foram transferidas para tubo cônico estéril (Corning, EUA) de 15mL e centrifugadas em RPMI (Sigma, Suíça) três vezes a 200xg por 5min. (Centrífuga Fanem, Brasil). As células sedimentadas foram ressuspensas em 1mL do meio RPMI-1640-C e a contagem do número de células viáveis feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (Boeco, Alemanha) através da técnica de exclusão com Azul de Trypan (Reagen, Brasil) a 0,04%. Após a contagem, as suspensões celulares foram ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades (Corning, EUA), 1,0mL por cavidade e acrescentadas de 34 $\mu$ L do estímulo Concanavalina A (ConA) (Sigma, EUA) na concentração de 0,5 $\mu$ g/mL – usada como controle positivo ou somente meio de cultura nos controles de células como controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA) por 24h. Após esta incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada (Hettich, Alemanha) a 4°C durante 10 min. a 7.000g. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliqüotados em tubos tipo *ependorfs* e estocados a -80°C para posterior dosagem de IFN- $\gamma$  e IL-4.

### **3.10. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR DOS MACRÓFAGOS**

Para a avaliação da citotoxicidade foi utilizada suspensão de células peritoneais, ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. As células foram estimuladas com LPS

ou tratadas somente com o meio de cultura RPMI-1640-C (controle negativo) (Sigma, Suíça).

Os experimentos foram realizados utilizando a técnica de MTT (MOSMANN, 1983), Nas placas de microtitulação de 96 cavidades, foram incubadas suspensões de células do exsudato peritoneal (100µL por cavidade). O tempo de incubação foi de 24 h em estufa a 37°C com tensão constante de 5% de CO<sub>2</sub> (Forma Scientific, EUA), variando de acordo com o experimento. Após esse período de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100µL de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (MTT) (Usb, EUA) a 1mg/mL diluído em tampão PBS (solução salina tamponada de fosfatos, pH 7,2) foram adicionados a cada orifício. A placa foi então incubada por mais 3h nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100µL de álcool isopropílico (Mallinckrodt, México) foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Somente células e meio de cultura RPMI-1640-C foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade dos macrófagos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia), em comprimento de onda de 540nm e filtro de referência 620nm.

### **3.11. AVALIAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DE MACRÓFAGOS**

#### **3.11.1. Determinação da produção de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por macrófagos peritoneais de ratos**

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada segundo o método descrito por Pick e Keisari em 1980, e adaptado por Pick e Mizel em 1981. A suspensão celular obtida após

o sacrifício dos animais foi ajustada a  $2 \times 10^6$  células/mL, em solução completa de vermelho de fenol, contendo: 140mM de NaCl (Merck, Brasil), 10mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, 5,5mM de dextrose (Merck, Alemanha); 0,56mM de vermelho de fenol (Berse, Brasil) e peroxidase de raiz forte, tipo II (0,01 mg/mL) (Sigma, EUA). Alíquotas de 100 $\mu$ L foram transferidas para microplacas de 96 cavidades (Corning, EUA) e acrescentados de 50 $\mu$ L de solução de zimosan A (de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, EUA) a 5 mg/mL em tampão fosfato de potássio ou somente tampão fosfato de potássio, como controle de células, e incubadas por 1h em estufa a 37°C com tensão constante de CO<sub>2</sub> (5 %) (Forma Scientific, EUA). Após a incubação, a reação foi interrompida com a adição de 50 $\mu$ L de NaOH 5 M (Sigma, Brasil), e a seguir foram feitas leituras em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia) a 620nm. As amostras foram analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos em nanomols de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2x10<sup>5</sup> células peritoneais, a partir de uma curva padrão previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão vermelho de fenol.

### **3.11.2. Determinação da produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de ratos**

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess com nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (Sigma, EUA) como padrão (GREEN et al., 1982).

A suspensão celular obtida foi ajustada a  $5 \times 10^6$  células/mL em meio de RPMI-1640-C (Sigma, Suíça), e foram distribuídas 100 $\mu$ L dessa suspensão celular em placas de 96 cavidades estéreis (Corning, EUA). Em algumas cavidades da placa, foram

adicionados 100µL da solução de LPS a 10µg/mL como agente estimulante. Em outras cavidades, foram adicionadas 100µL de meio RPMI-1640-C (Sigma, Suíça) à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). Como controle dos reagentes foi utilizado somente meio de cultura RPMI-1640-C (Sigma, Suíça) e LPS (Sigma, Alemanha), sem a suspensão celular. A placa assim constituída foi incubada por 24h em estufa a 37°C com tensão constante de CO<sub>2</sub> (5 %) (Forma Scientific, EUA). Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50µL de cada amostra, passadas para uma outra placa e adicionados mais 50µL/cavidade de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naphthyl-etilenodiamina, 1% de sulfanilamida em solução ácido fosfórico a 2,5%. Após 10min. à temperatura ambiente, a absorbância das placas foi lida em 540nm em espectrofotômetro UV/Visível (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia). As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de NaNO<sub>2</sub> (Sigma, EUA) em meio RPMI-1640-C (Sigma, Suíça). Os testes foram realizados em triplicata e os valores expressos em micromols de NO/5x10<sup>5</sup> células.

### **3.11.3. Determinação da produção das citocinas IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-γ e IL-4**

As citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α foram quantificadas nos sobrenadantes obtidos das culturas de macrófagos peritoneais (item 3.8.), e as citocinas IFN-γ e IL-4 nos sobrenadantes obtidos das culturas de células esplênicas (item 3.9.), através do teste imunoenzimático ELISA de captura, utilizando os Kits BD OptEIA<sup>®</sup> (EUA) de acordo com as instruções do fabricante.



As microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning, EUA) foram adsorvidas com um anticorpo de captura anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$  ou anti-IL-4 de rato purificado a 4 $\mu$ g/mL (100  $\mu$ L/cavidade) em tampão PBS e incubadas *overnight* (aproximadamente 18h) a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,0 contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) (Merck, Alemanha). Após a lavagem, foram bloqueadas com 300 $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma, EUA) a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 min. e lavadas 3 vezes com PBS-T. Foram adicionados à cada placa os padrões das respectivas citocinas ou os sobrenadantes das culturas a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min e lavadas 4 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra anti-IL-1 $\beta$ , anti-IL-6, anti-TNF- $\alpha$ , anti-IFN- $\gamma$  e anti-IL-4 de rato marcado com biotina na concentração de 400 ng/mL em diluente de reagente (1%BSA, 0,05% de Tween 20 em tampão Tris-NaCl). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 min e lavadas 3 vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100  $\mu$ L do conjugado peroxidase-streptavidina diluído em PBS/BSA e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 min. Após esse processo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e 100  $\mu$ L do substrato (10mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina (Sigma, EUA) e 1,2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram adicionados em cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A absorbância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/Visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems, Finlândia) e as concentrações das citocinas foram quantificadas utilizando uma curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas dos padrões de IL-1 $\beta$ , IL-

6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  ou IL-4. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em picogramas/mL.

### 3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

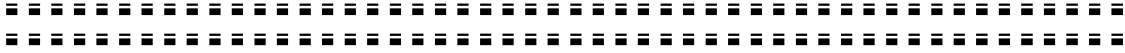
Os dados obtidos para todos os grupos em todos os ensaios apresentaram distribuição normal, portanto testes paramétricos foram utilizados para as análises dos resultados como descrito a seguir:

(a) Teste T pareado para comparações dentro do mesmo grupo;

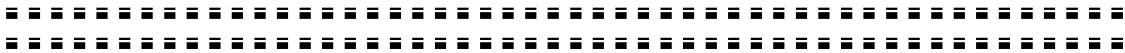
(b) Análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para comparações entre os diferentes grupos (para essa análise, os valores obtidos na produção com estímulo foram descontados dos valores obtidos na produção espontânea);

(c) Teste de Pearson para as análises de correlação entre os diferentes mediadores.

Os resultados dos testes T e das análises de variância estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e as análises de correlação representadas pelo valor de "R". O valor de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$ . Para tal foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 3.00, para Windows, Software GraphPad, San Diego California USA (MOTULSKY, 1999).



## *4. Resultados*

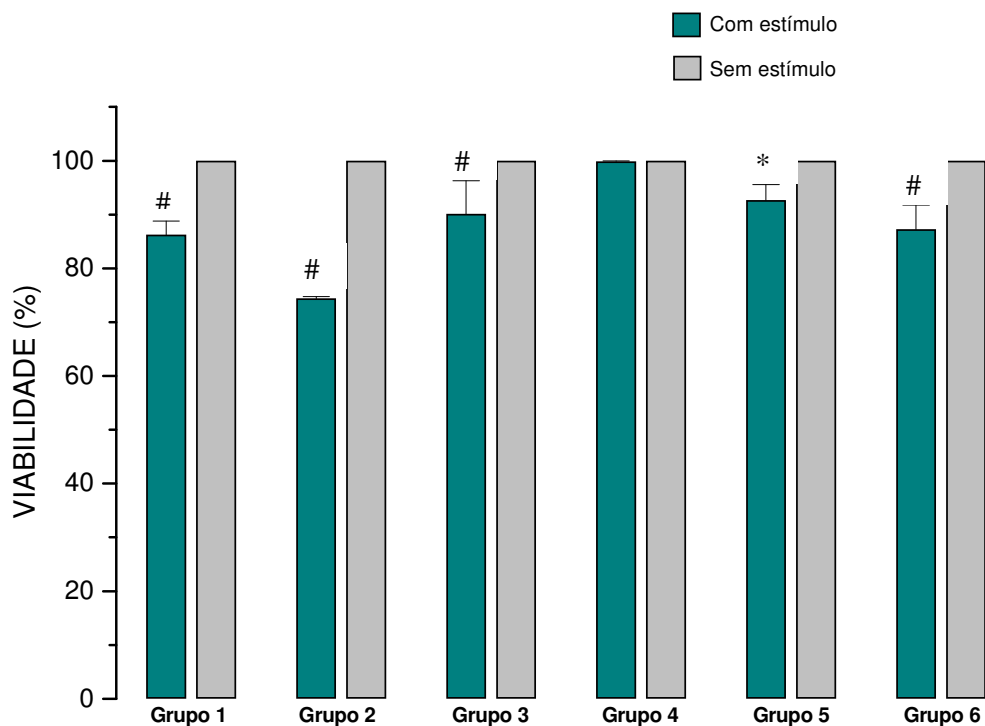


#### **4.1. Determinação da Viabilidade Celular de Macrófagos**

A determinação da viabilidade celular foi realizada em células do exsudato peritoneal obtidas de ratos. As células foram mantidas por 24h em meio de cultura RPMI-1640-C. Os resultados obtidos nos diferentes grupos de tratamento estão ilustrados na Figura 1.

Para alguns grupos houve diferença estatisticamente significativa quando a viabilidade das células tratadas com o LPS foi comparada com os seus respectivos controles sem o estímulo, sendo  $p \leq 0,001$  para os grupos 1, 2,3 e 6;  $p \leq 0,01$  para o Grupo 5 e  $p > 0,05$  para o Grupo 4 (sem diferença estatística nesse grupo).

A viabilidade celular encontrada nos diferentes grupos de estudo foi ao redor de 74,40 (no Grupo 2 com estímulo) a 100% (todos os grupos sem estímulo).



**Figura 1: Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As células do exsudato peritoneal dos animais cultivadas em presença de estímulo (LPS) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C) foram previamente ajustadas à concentração de  $5 \times 10^6$  células/mL. As células em meio de cultura (RPMI-1640-C) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Cada ponto e barra representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o teste T-pareado.

\*  $p \leq 0,01$  quando comparado ao seu respectivo controle sem estímulo

#  $p \leq 0,001$  quando comparado ao seu respectivo controle sem estímulo

## **4.2. Avaliação da produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ERO) e Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN) em culturas de macrófagos peritoneais de ratos**

### **4.2.1. Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

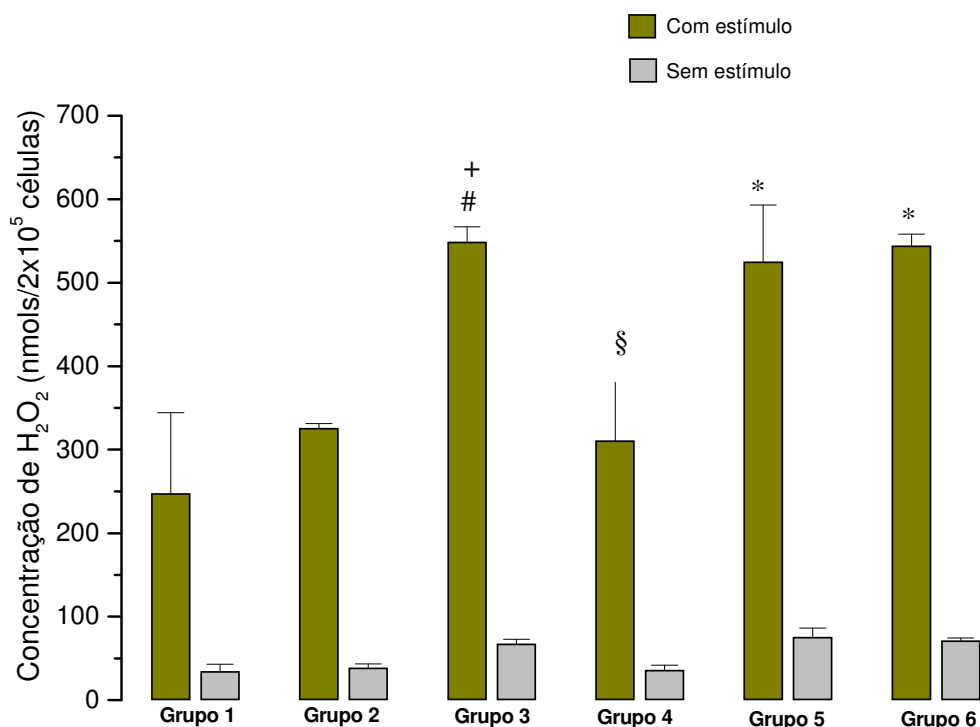
A determinação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada nos sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal de ratos. A cultura foi realizada em presença de Zimosan e somente solução de tampão completo de fosfato de potássio utilizado como diluente na reação.

Na Figura 2 mostramos os dados obtidos na determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Observamos ao compararmos os grupos controles, que não apresentaram tumor (Grupos 1, 5 e 6) menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo Grupo 1, diferença estatisticamente significativa em relação aos que receberam produto fermentado (Grupo 5) e aos que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio (Grupo 6), sendo  $p \leq 0,001$  para ambos.

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo Grupo 3, o qual recebeu o produto fermentado não suplementado, sendo  $p \leq 0,001$  em relação ao Grupo 2. Ao compararmos os Grupos 2 e 4 a diferença estatística não foi significativa ( $p > 0,05$ ), enquanto que entre os Grupos 3 e 4 a produção foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam os mesmos tratamentos, observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3), embora tenha produzido maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, quando comparamos a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), os quais receberam o produto fermentado suplementado com cálcio,

verificamos que o Grupo 4 produziu concentração estatisticamente menor de  $H_2O_2$  ( $p \leq 0,001$ ).



**Figura 2: Produção de  $H_2O_2$  em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As células do exsudato peritoneal dos animais foram cultivadas em presença de estímulo (Zimosan) ou somente células dos animais sem estímulo (tampão fosfato). As concentrações de  $H_2O_2$  foram obtidas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de  $H_2O_2$  e os resultados foram expressos em nmols de  $H_2O_2/2 \times 10^5$  células. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

\* $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 1

#  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 2

§  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 6

+  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 4

#### 4.2.2. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

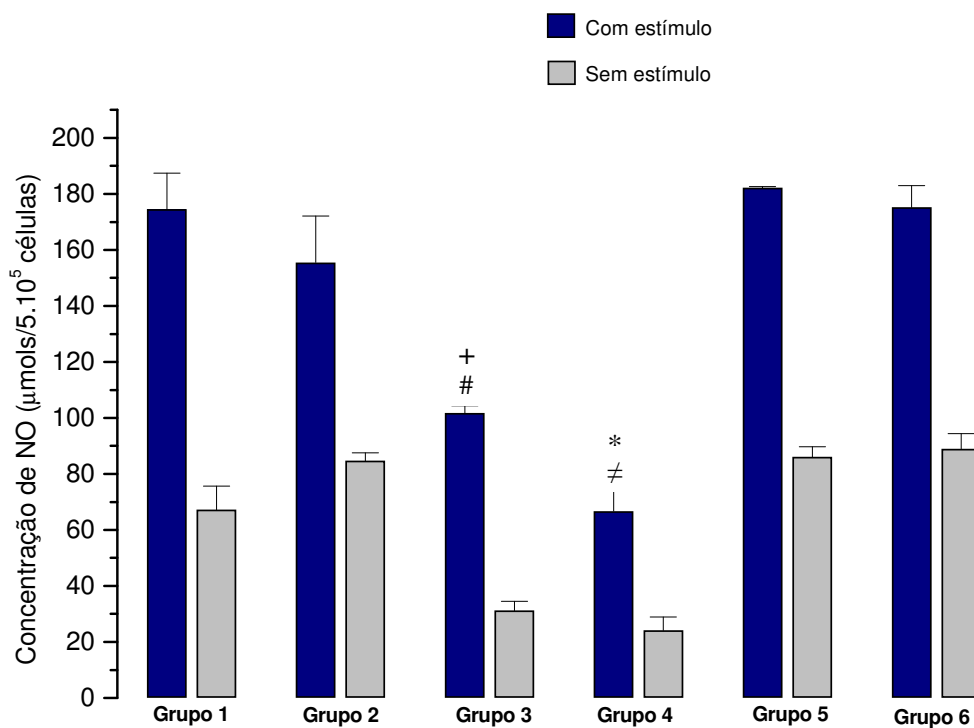
A determinação da produção de NO foi realizada em sobrenadantes de culturas de células do exsudato peritoneal de ratos. A cultura foi realizada em presença do LPS e somente meio RPMI-1640-C. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.

Na determinação de NO, observamos ao compararmos os grupos controles, que não apresentaram tumor, (Grupos 1, 5 e 6) alta produção de NO, entretanto a diferença estatística não foi significativa quando comparados entre si ( $p > 0,05$ ).

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos maior produção de NO pelo Grupo 2 (animais com tumor que não receberam tratamento com derivados da soja), diferença estatisticamente significativa quando comparada ao Grupo 4 ( $p \leq 0,001$ ), porém não significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparado com o Grupo 3. Ao compararmos os Grupos 3 e 4 entre si verificamos uma produção estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ).

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam os mesmos tratamentos, observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3) produziu menor concentração de NO que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), sendo a diferença entre ambos estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). Quando comparamos a produção de NO entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), os quais receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, verificamos que o Grupo 4 produziu concentração estatisticamente menor de NO ( $p \leq 0,001$ ).





**Figura 3: Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As células do exsudato peritoneal dos animais foram cultivadas em presença de estímulo (LPS) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C). As concentrações de nitrito foram obtidas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mols}/5 \times 10^5$  células. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

\* $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 2

#  $p \leq 0,05$ : em relação ao Grupo 5

$\neq$   $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 6

+  $p \leq 0,01$ : em relação ao Grupo 4

### 4. 3. Determinação das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ e IL-4

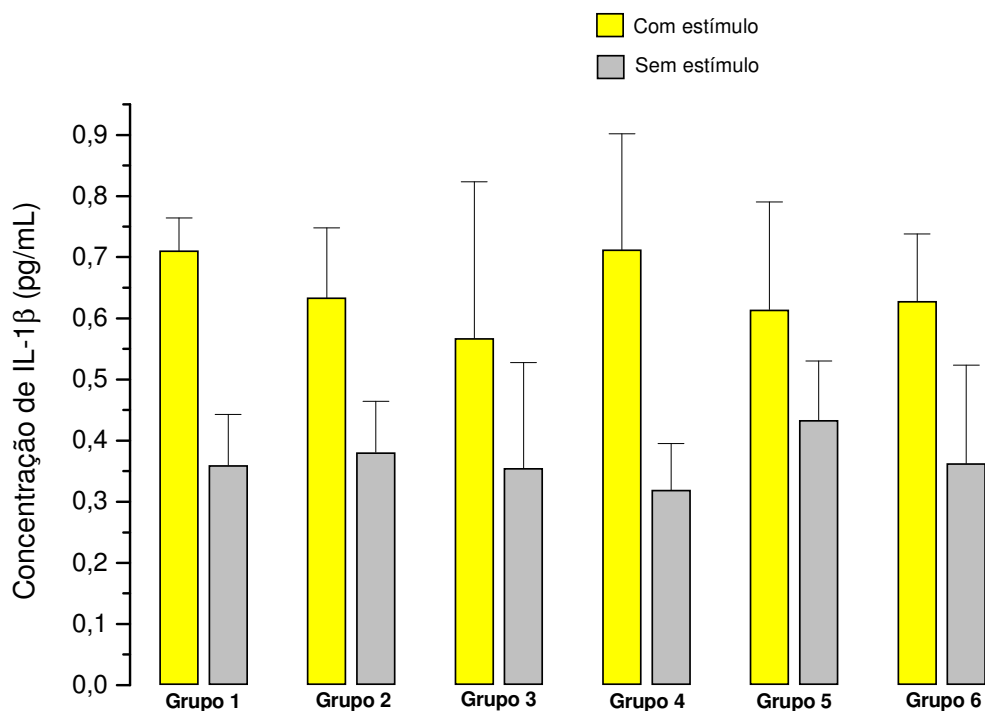
#### 4.3.1. Determinação da produção de IL-1 $\beta$

A determinação da produção de IL-1 $\beta$  foi realizada nos sobrenadantes de culturas de células aderentes de ratos. A cultura foi realizada em presença de LPS e somente RPMI-1640-C (Figura 4).

Quando comparamos os grupos controles, que não apresentaram tumor, (Grupos 1, 5 e 6) notamos que a produção de IL-1 $\beta$  pelo Grupo 1 não foi estatisticamente significativa em relação aos grupos 5 e 6 ( $p>0,05$ ).

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos maior produção de IL-1 $\beta$  pelo Grupo 2, sendo a produção estatisticamente não significativa ( $p>0,05$ ) em relação aos outros grupos.

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam os mesmos tratamentos observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3), embora tenha produzido maior concentração de IL-1 $\beta$  que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). Quando comparamos a produção de IL-1 $\beta$  entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, verificamos que o Grupo 4 também não produziu concentração estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).



**Figura 4: Concentração de IL-1 $\beta$  produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As culturas de células aderentes foram cultivadas em presença de estímulo (LPS) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C). As concentrações de IL-1 $\beta$  foram calculadas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-1 $\beta$ . Os resultados expressos em pg/mL. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

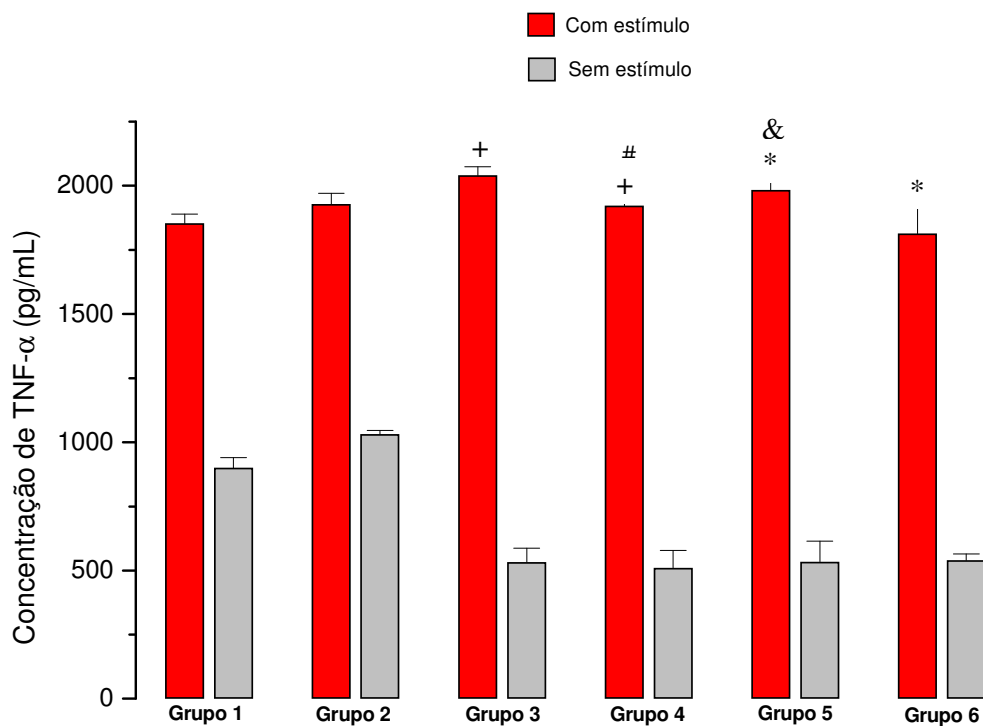
#### 4.3.2. Determinação da produção de TNF- $\alpha$

A determinação da produção de TNF- $\alpha$  foi realizada nos sobrenadantes de culturas de células aderentes de ratos. A cultura foi realizada em presença de LPS e somente RPMI-1640-C (Figura 5).

Na Figura 5, os resultados dos testes para determinação de TNF- $\alpha$  mostraram que quando comparamos os grupos controles, que não apresentaram tumor, (Grupos 1, 5 e 6) observamos que a produção de TNF- $\alpha$  pelo Grupo 1 foi menor e estatisticamente significativa em relação aos grupos 5 e 6 ( $p \leq 0,001$ ). Já entre os Grupos 5 e 6 observamos uma produção estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ).

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos maior produção de TNF- $\alpha$  pelo Grupo 3, com produção estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ) em relação ao Grupo 2. Os Grupos 3 e 4 não foram estatisticamente significativos quando comparados entre si ( $p > 0,05$ ).

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam o mesmo tratamento observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3), embora tenha produzido maior concentração de TNF- $\alpha$  que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, quando comparamos a produção de TNF- $\alpha$  entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, verificamos que o Grupo 4 produziu maior concentração de TNF- $\alpha$ , estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 5: Concentração de TNF- $\alpha$  produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As culturas de células aderentes foram cultivadas em presença de estímulo (LPS) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C). As concentrações de TNF- $\alpha$  foram calculadas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de TNF- $\alpha$ . Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

\* $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 1

+  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 2

#  $p \leq 0,05$ : em relação ao Grupo 6

&  $p \leq 0,01$ : em relação ao Grupo 6

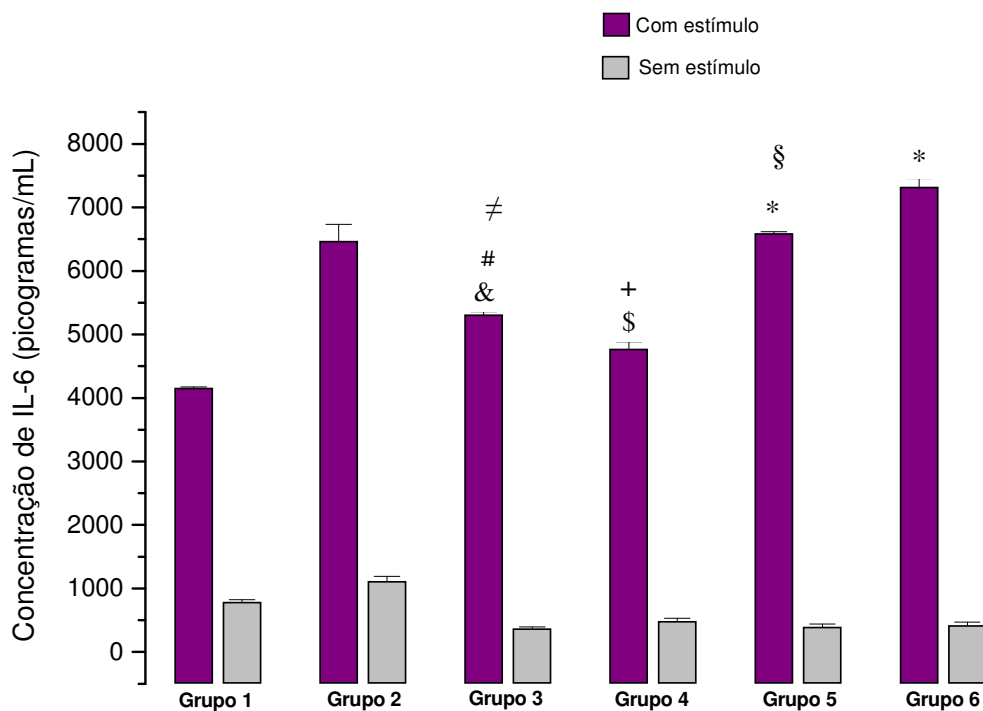
### 4.3.3. Determinação da produção de IL-6

A determinação da produção de IL-6 foi realizada nos sobrenadantes de culturas de células aderentes de ratos. A cultura foi realizada em presença de LPS e somente RPMI-1640-C (Figura 6).

Quando comparamos os grupos controle, que não apresentaram tumor, (Grupos 1, 5 e 6) observamos que a produção de IL-6 pelo Grupo 1 foi menor em relação aos Grupos 5 e 6, sendo esta estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos maior produção de IL-6 pelo Grupo 2, com produção estatisticamente significativa  $p \leq 0,01$  em relação ao Grupo 3 e  $p \leq 0,001$  em relação ao Grupo 4. Comparando-se os Grupos 3 e 4 entre si ocorreu diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam o mesmo tratamento observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3) produziu menor concentração de IL-6 que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ). O mesmo se observa quando comparamos a produção de IL-6 entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, verificando-se que o Grupo 4 produziu menor concentração, estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).



**Figura 6: Concentração de IL-6 produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As culturas de células aderentes foram cultivadas em presença de estímulo (LPS) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C). As concentrações de IL-6 foram calculadas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-6. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

\* $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 1

#  $p \leq 0,01$ : em relação ao Grupo 2

+  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 2

&  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 5

\$  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 6

§  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 6

≠  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 4

#### 4.3.4. Determinação da produção de IFN- $\gamma$

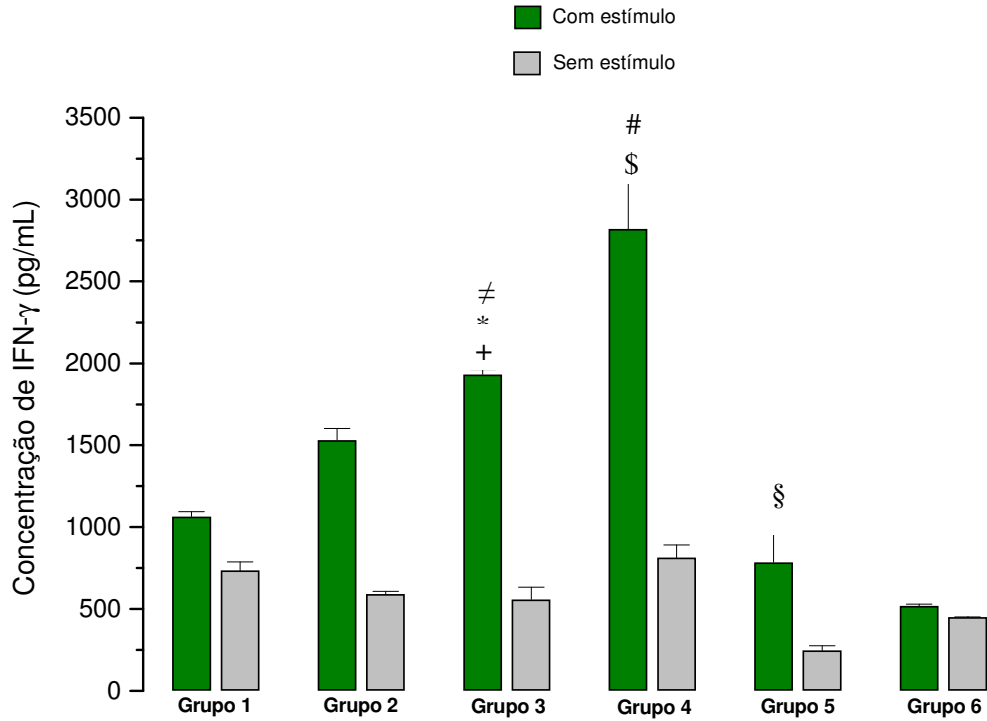
A determinação da produção de IFN- $\gamma$  foi realizada em sobrenadantes de culturas de células esplênicas de ratos. A cultura foi realizada em presença de ConA e somente meio RPMI-1640-C. Os resultados obtidos estão representados na Figura 7.

Quando comparamos os grupos controles, que não apresentaram tumor, (Grupos 1, 5 e 6) observamos que embora a produção de IFN- $\gamma$  pelo Grupo 1 seja maior não foi estatisticamente significativa em relação aos Grupos 5 e 6 ( $p > 0,05$ ). Comparando-se os Grupos 5 e 6 entre si a produção foi estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos menor produção de IFN- $\gamma$  pelo Grupo 2 com produção estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ), quando comparada ao Grupo 3, e  $p \leq 0,001$  em relação ao Grupo 4. Ao compararmos os Grupos 3 e 4 entre si observamos uma produção de IFN- $\gamma$  estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ).

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam o mesmo tratamento observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3) produziu maior concentração de IFN- $\gamma$  que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,001$ ). O mesmo ocorre quando comparamos a produção de IFN- $\gamma$  entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, verificamos que o Grupo 4 produziu concentração estatisticamente maior de IFN- $\gamma$  ( $p \leq 0,001$ ).





**Figura 7: Concentração de IFN- $\gamma$  produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As culturas de células esplênicas foram cultivadas em presença de estímulo (ConA) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C). As concentrações de IFN- $\gamma$  foram calculadas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IFN- $\gamma$ . Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

\*  $p \leq 0,01$ : em relação ao Grupo 2

#  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 2

+  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 5

\$  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 6

§  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 6

≠  $p \leq 0,001$ : em relação ao Grupo 4

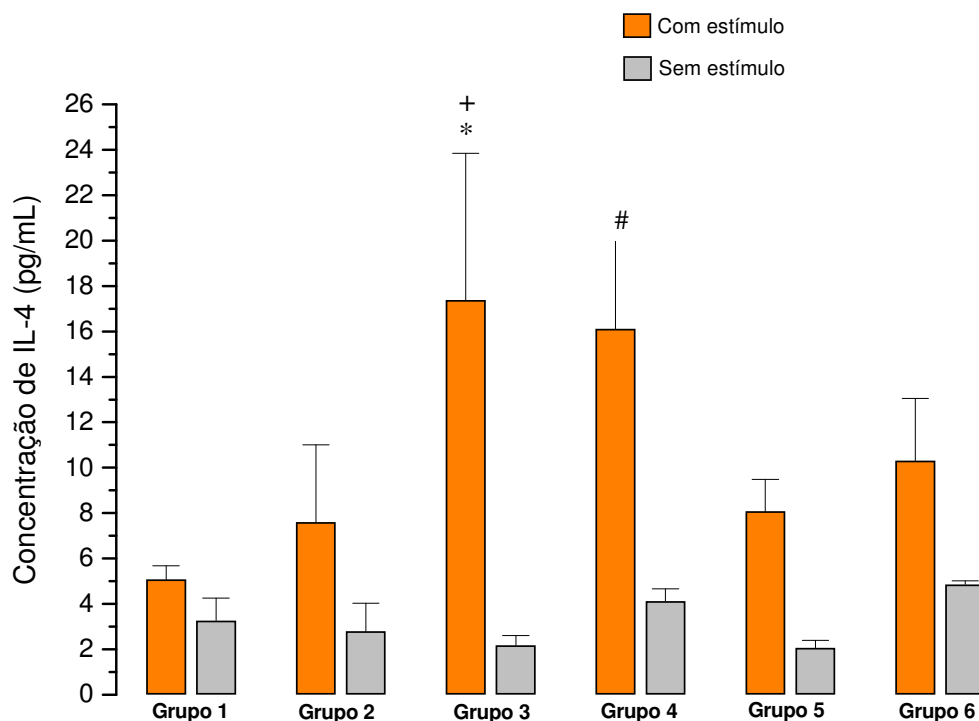
#### 4.3.5. Determinação da produção de IL-4

A determinação da produção de IL-4 foi detectada nos sobrenadantes de culturas de células esplênicas de ratos. A cultura foi realizada em presença de ConA e somente RPMI-1640-C (Figura 8).

Quando comparamos os grupos controle, que não apresentaram tumor, (Grupos 1, 5 e 6) observamos que a produção de IL-4 pelo Grupo 1 não foi estatisticamente significativa em relação aos Grupos 5 e 6 ( $p > 0,05$ ).

Entre os animais que desenvolveram o tumor (Grupos 2, 3 e 4) verificamos menor produção de IL-4 pelo Grupo 2, diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ), quando comparada com o Grupo 3 e com o Grupo 4 ( $p \leq 0,05$ ). Entre os Grupos 3 e 4 a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Quando comparamos os grupos induzidos ao tumor com os grupos não induzidos e que receberam o mesmo tratamento observamos que o grupo com tumor, o qual recebeu o produto fermentado (Grupo 3) produziu maior concentração de IL-4 que o grupo que recebeu o mesmo tratamento sem o tumor (Grupo 5), apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,01$ ). Quando comparamos a produção de IL-4 entre o Grupo 4 (com tumor) e o Grupo 6 (sem tumor), que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio, verificamos que o Grupo 4 produziu maior concentração, no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 8: Concentração de IL-4 produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.** As culturas de células esplênicas foram cultivadas em presença de estímulo (ConA) ou somente células dos animais sem estímulo (RPMI-1640-C). As concentrações de IL-4 foram calculadas através de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações conhecidas de IL-4. Os resultados foram expressos em pg/mL. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco animais realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) utilizando o teste de Tukey para comparações entre os grupos.

\* $p \leq 0,01$ : em relação ao Grupo 2

#  $p \leq 0,05$ : em relação ao Grupo 2

+  $p \leq 0,01$ : em relação ao Grupo 5

#### 4.4 Análise da correlação entre os mediadores

A Tabela 9 apresenta uma análise da correlação entre os diferentes mediadores dentro de cada grupo estudado.

**Tabela 9:** Correlação entre os parâmetros imunológicos analisados nos diversos grupos de tratamento

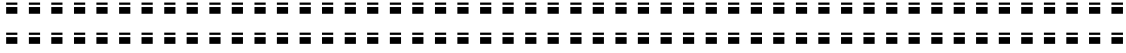
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x NO	-	-	-	-	R=0,9144*	R=0,6535*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IL-1	-	-	R=0,8420*	-	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IL-6	-	R=0,6708*	-	-	-	R=0,9858&
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x TNF	-	R=0,7293*	-	-	-	R=0,9858&
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IFN- $\gamma$	-	-	R=0,7597*	-	R=0,9790&	R=0,9858&
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IL-4	-	-	R=0,8453*	-	-	-
NO x IL-1	-	-	-	R=0,9541*	-	-
NO x IL-6	-	-	R=0,7978*	-	-	R=0,6682*
NO x TNF	-	-	-	R=0,6877*	-	R=0,6682*
NO x IFN- $\gamma$	R= 0,8460*	-	R=0,7880*	-	R=0,9772&	R=0,6682*
NO x IL-4	-	-	R=0,6960*	-	-	-
IL-1 x IL-6	-	-	R=0,6980*	-	R=0,9757&	-
IL-1 x TNF	-	-	-	-	R=0,9616+	-
IL-1 x IFN- $\gamma$	R=0,8460*	-	R=0,8175*	-	-	-
IL-1 x IL-4	-	-	-	-	R=0,8880+	-
IL-6 x TNF	-	-	-	R=0,7403*	R=0,9873&	R=1,000&
IL-6 x IFN- $\gamma$	-	R=0,9786&	R=0,9710+	-	-	R=1,000&
IL-6 x IL-4	-	R=0,7174*	-	-	R=0,9143+	-
TNF x IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	R=1,000&
TNF x IL-4	-	R=0,8249*	-	-	R=0,9665+	-
IFN- $\gamma$ x IL-4	-	-	R=0,6837*	-	-	-

A análise de correlação foi realizada através do Teste de Pearson.

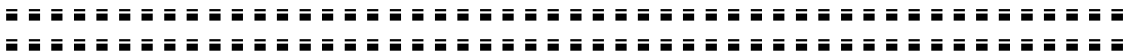
\*  $p \leq 0,05$

+  $p \leq 0,01$

&  $p \leq 0,001$



## *5. Discussão*



A função primordial do sistema imune é proteger o hospedeiro contra invasão de patógenos através de diferentes componentes celulares incluindo macrófagos, neutrófilos, linfócitos (T e B). Essas células em resposta aos danos teciduais migram rapidamente para o sítio da agressão iniciando uma resposta inflamatória (JANEWAY, 2001).

O câncer de cólon é uma das principais causas de mortalidade nos países ocidentais (PARKER et al., 1996). Platz et al. (2000) estimaram que mais de 70% de risco de câncer de cólon são evitáveis através de uma combinação dietética e mudanças de estilo de vida.

O tumor de cólon pode ser inibido pela ingestão de iogurte ou outros produtos fermentados cujo efeito pode estar relacionado com a ativação de células do sistema imune associadas à mucosa intestinal (KAMPMAN et al, 2004).

O papel da dieta na etiologia do câncer recebeu grande atenção nos últimos anos. Podemos destacar a relação entre o câncer de cólon e certos constituintes alimentares. A literatura tem demonstrado um papel protetor de produtos fermentados contra o desenvolvimento de tumores de cólon, fato esse corroborado por evidências epidemiológicas (PETERS et al., 1992). Além disso, produtos fermentados ou bactérias usadas na fermentação mostraram efeitos benéficos no câncer de cólon e em certos tipos de tumores em modelos murinos de carcinogênese (AYEDO et al., 1981; SHACKELFORD et al., 1983; REDDY e RIVENSON, 1993; PAIVA, 2005; KINOUCI, 2006).

O iogurte de soja, como anteriormente mencionado, consiste de uma combinação de dois alimentos funcionais (ROSSI, 2000). A proteína de soja é considerada pela Organização Mundial de Saúde, como a única proteína vegetal de alto valor biológico, que contém todos os aminoácidos essenciais necessários para o

crescimento e manutenção do organismo humano (BESHKOVA et al., 1998). O grão da soja contém 5 classes de componentes, sendo que estes possuem propriedades anticarcinogênicas. Tais componentes são isoflavonas, saponinas, ftalato, inibidores de protease e fitoesteróis (MESSINA e BARNES, 1991).

Entre esses componentes, a literatura mostra que as saponinas apresentam atividade antioxidante protegendo contra o dano celular no câncer de cólon (SUNG et al., 1995).

Os ftalatos são conhecidos por sua capacidade de se ligar a minerais como o cálcio e o ferro, tornando-os indisponíveis para a absorção. Em caso de consumo excessivo de ferro, tal mecanismo é benéfico, pois auxilia na prevenção da formação de radicais livres através do desenvolvimento de tumores. Também inibem diretamente o crescimento de células cancerígenas (SHAMSUDDIN et al., 1996).

Os inibidores de protease interferem na digestão de proteínas. São inativados em altas temperaturas, sendo encontrados na soja em pequenas quantidades (ANDERSON e WOLF, 1995). Estudos em animais mostram que os inibidores de protease suprimem diversos tipos de cânceres *in vivo* (KENNEDY, 1995).

Outro anticarcinógeno presente na soja, o fitoesterol, é um composto vegetal não absorvido pelos humanos. Desta forma, ao ser ingerido alcança o cólon intacto, onde parece exercer efeito protetor através da inibição da carcinogênese (YASUKAWA et al., 1991). Muitas pesquisas investigam individualmente os efeitos dos compostos da soja. Entretanto, é importante ressaltar que tais efeitos combinados podem ser mais úteis.

As BAL têm sido utilizadas na fermentação de alimentos durante os últimos 4000 anos sendo atualmente utilizadas na fermentação dos produtos derivados de leite do mundo inteiro, incluindo iogurte, queijo, dentre outros.

O processo de fermentação tem sido utilizado por milhares de anos como um modo seguro de armazenar alimentos perecíveis. Além de alterar o sabor original dos alimentos, o processo de fermentação pode melhorar a digestão de carboidratos e proteínas, aumentar os níveis de algumas vitaminas e sais minerais (HARTLEY e DENARIAZ, 1993).

Para a fermentação do leite são inoculadas culturas concentradas de bactérias. Durante esse processo ocorre a produção de ácido láctico através da lactose liberada pelas bactérias do iogurte (SODINI et al., 2004). Tais bactérias são homofermentativas, ou seja, produzem um único produto principal final, no caso o ácido láctico, que constitui 95% dos produtos de fermentação (SOUKOULIS et al., 2007). A concentração final do ácido láctico no iogurte é entre 0,7-1,2%, caracterizando o gosto ligeiramente azedo e refrescante. Este ácido é a mistura dos isômeros L(+) e D(-). Embora a quantidade de cada isômero presente dependa da cultura específica, o isômero L(+) geralmente representa entre 50-70% do total de ácido láctico (TAMIME e DEETH, 1980).

Os efeitos mais evidentes dos probióticos envolvem mudanças na quantidade viável de microorganismos na microbiota intestinal após sua ingestão, que pode ser causada por competição pelos sítios de adesão e nutrientes entre microorganismos ingeridos e patógenos potenciais (TEJADA-SIMON et al., 1999). Afirma-se também que as culturas lácticas podem aumentar a absorção de certos nutrientes, aliviar os sintomas de intolerância à lactose, aumentar o metabolismo de certas drogas, reduzir o colesterol sérico (ROSSI et al., 1999), aumentar a motilidade intestinal, efeitos anticarcinogênicos, inativar enterotoxinas bacterianas e estimular o sistema imune (FULLER, 1991; GILLILAND, 1991; VENDRAMINI, 2002).

As BAL aparentemente aumentam várias funções do sistema imune, incluindo ativação de macrófagos e linfócitos, produção de anticorpos e resposta proliferativa no



baço e em placas de Peyer. Foi proposto que a ingestão destas bactérias pode aumentar a resistência a infecções por microorganismos patogênicos e que também aumentam o potencial de prevenir o câncer. Acredita-se que estas atividades devem originar-se da capacidade que têm estas bactérias em estimular macrófagos e linfócitos T (PARK et al., 1999). Perdigon et al., em 1987, observaram que a cultura láctica feita com *Lactobacillus acidophilus* diminuiu significativamente o nível de enzimas envolvidas no desenvolvimento de câncer de cólon.

Propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas de bactérias probióticas ingeridas em alimentos têm sido muito estudadas. As propriedades anticarcinogênicas estão representadas na degradação de pró-carcinogênicos, na produção de compostos antimutagênicos, na modulação de enzimas pró-carcinogênicas no intestino, e supressão de tumores por mecanismos de resposta imune (MESSINA, 1995).

Estudos em humanos têm mostrado que bactérias probióticas podem ter efeito positivo no sistema imune do hospedeiro. No entanto, têm-se observado diferenças no efeito imunomodulador quando se trata de bactérias probióticas diferentes. Algumas cepas de *L. acidophilus* LA1 e *L. salivarius* UCC 118 estimularam a resposta da mucosa com a produção de IgA e o aumento da atividade fagocítica (PERDIGON et al., 1986).

Os macrófagos são células que se originam dos monócitos provenientes da medula óssea, que após migrarem para os tecidos, se diferenciam em macrófagos maduros. Constituem a segunda maior população celular do sistema imune. A fagocitose é a primeira função destas células que desempenham um papel importante na resposta imune inata do intestino, e representam uma das primeiras linhas de defesa não-específicas contra invasão bacteriana (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005).

Os macrófagos podem ser ativados a partir da estimulação com LPS e IFN- $\gamma$ . Uma das principais características dos macrófagos ativados é o aumento de sua

capacidade de liberar mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos como intermediários do oxigênio e nitrogênio, enzimas hidrolíticas e citocinas citotóxicas as quais podem agir na destruição de antígenos. No entanto, esses mediadores são muito específicos. A liberação em excesso e descontrolada pode destruir tecidos normais (MONCADA et. al., 1991).

Outra característica dos macrófagos ativados é a capacidade de distinguir células normais das células com mitose estimulada ou células tumorais e lisar apenas as tumorais. Esse reconhecimento seletivo pode ocorrer pela ligação de macrófagos ativados específicos na superfície da membrana celular (FILDER e SCHROIT, 1998).

Primeiramente neste trabalho, foi analisada a viabilidade celular dos macrófagos, antes da realização dos testes imunológicos propriamente ditos, de forma que se assegurasse a capacidade destas células responderem aos estímulos utilizados.

Foi empregada a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólico (MTT) para verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida da viabilidade celular (MOSMAN, 1983). A metodologia baseia-se na redução de um sal de tetrazólio amarelo solúvel por enzimas microssomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Essa redução gera a formazana, um produto insolúvel de cor púrpura que se acumula nas células devido a sua incapacidade de atravessar a membrana celular. A adição do álcool isopropílico solubiliza e libera a formazana produzida, possibilitando a quantificação colorimétrica.

A determinação da viabilidade celular foi realizada em células do exsudato peritoneal obtidas de ratos. Essas células foram mantidas em cultura por 24h. Pode-se observar claramente que o não tratamento dos animais (Grupo 2) fez com que as suas células ficassem mais suscetíveis à incubação, fato esse observado pela menor taxa de

viabilidade ( $74,40 \pm 0,38$ ) quando comparada com os valores encontrados pelos outros grupos do estudo. Os resultados obtidos demonstram também que a viabilidade encontrada (igual ou superior a 70%) fornece um número de células viáveis suficiente para garantir uma resposta adequada em cultura após a manipulação e frente ao LPS (Fig. 1).

Schaafsma et al. (1988), usando modelos de ratos, investigaram o efeito dos alimentos funcionais na absorção mineral demonstrando que a lactose aumenta a absorção de cálcio, magnésio e zinco. Pelo fato do iogurte ter um menor conteúdo de lactose que o de leite, a biodisponibilidade destes minerais pode ser afetada negativamente, embora seja provável que o efeito seja pequeno.

Newmark et al. (1984) postularam que o cálcio liga-se a ácidos biliares secundários e ácidos graxos na colônia do lúmen, diminuindo o potencial proliferativo destas combinações na mucosa. Cálcio também pode reduzir o risco de câncer colorretal através de efeitos diretos na proliferação celular, diferenciação e apoptose (LAMPRECHT e LIPKIN, 2003). Estudos em animais e algumas tentativas clínicas mostraram que o aumento no consumo de cálcio e alimentos funcionais pode diminuir a proliferação de células epiteliais (LIPKIN, 1999).

Durante a última década, vários estudos demonstraram que o risco de câncer de cólon reduziu através de alto consumo de cálcio dietético (WALLACE et al., 2004). O cálcio pode conferir proteção contra o câncer de cólon através de vários mecanismos biológicos (LARSSON et al., 2006). Uma das hipóteses do mecanismo de ação do cálcio é que ele pode se ligar aos ácidos biliares e ionizar os ácidos graxos, promovendo assim a proliferação das células epiteliais no cólon (NEWMARK e WARGOVICH, 1986). Por este motivo, achamos conveniente adicionar cálcio aos produtos

administrados aos animais com tumor de cólon induzidos quimicamente e avaliar seu efeito preventivo contra o câncer de cólon através da estimulação do sistema imune.

Dentre os numerosos produtos secretados pelos macrófagos, existem dois grupos de compostos inorgânicos com um alto grau de reatividade química: as espécies reativas do oxigênio (ERO) que inclui o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido e, em certas populações de fagócitos mononucleares, os produtos da mieloperoxidase, e as espécies reativas do nitrogênio (ERN), onde se inclui o óxido nítrico (NO), nitritos e dióxido de nitrogênio (COTTON e WILKINSON, 1992).

É documentado que espécies reativas como o radical hidroxila (OH), superóxido ( $O_2^-$ ),  $H_2O_2$  e peróxido de nitrito são produzidos por células inflamatórias (NATHAN, 1987). Estudos demonstram que esses radicais do oxigênio e nitrogênio podem apresentar papel na modulação em funções fisiológicas na respiração e epitélio pulmonar, incluindo frequência de batimento ciliar, secreção de muco e apoptose.

O  $H_2O_2$  apresenta diferentes funções no organismo; age como sinalizador de moléculas, como agente citotóxico no sistema de defesa entre outras (FORMAN e TORRES, 2002; HALLIWELL et al., 2000). Também atua como um agente tóxico produzido pelos macrófagos durante o "burst oxidativo" para destruir os microorganismos fagocitados (CLÉMENT et al., 1998).

Quando comparamos a produção de  $H_2O_2$  (Fig. 2) entre os grupos controle (1,5 e 6) observamos menor produção no Grupo 1, o que sugere que a ingestão do produto fermentado suplementado ou não com o cálcio estimulou maior produção desta molécula. Dentre os animais que desenvolveram tumor (2, 3 e 4) verificamos maior produção no Grupo 3, que foram tratados com o produto fermentado sem a suplementação com o cálcio, sugerindo que o cálcio na presença de tumor diminuiu a produção desse mediador, podendo refletir nesse em menor agressão sobre as células

adjacentes, ou seja, menor taxa de morte celular por citotoxicidade direta por sua produção (RAMASARMA, 1990). Nesse ponto podemos salientar a importância do produto fermentado na restauração da resposta imunológica com indução do "burst oxidativo", tal como verificado nos grupos de animais com resposta normal (Grupos 5 e 6) e no Grupo 3 (com tumor).

Wang et al. (2006) observaram uma maior atividade antioxidante no leite fermentado quando as BAL apresentavam-se associadas do que quando se apresentavam isoladamente. Além disso, a atividade antioxidante aumentava ainda mais quando o período de fermentação era estendido.

O NO é um radical livre produzido pelos macrófagos em resposta a uma série de estímulos desempenhando um papel regulatório no início do desenvolvimento de várias respostas inflamatórias e imunes (MONCADA e HIGGS, 1995).

O NO não é um oxidante forte, porém essa molécula reage com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), levando à formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ), os quais dramaticamente aumentam a toxicidade do NO e  $O_2^-$  isolados. O peroxinitrito é capaz de oxidar várias moléculas biológicas (ISCHIROPOULOS et al., 1996; WANG et al., 2000).

O determinante para produção de maiores ou menores quantidades de NO depende da duração da atividade nas células normais do hospedeiro, em condições fisiológicas (WENNMALM, 1994).

Segundo Salvemini et al. (1996), o NO é um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua capacidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias.

O NO medeia vários fenômenos, como a vasodilatação dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sanguínea basal, depressão sináptica a longo prazo, potencialização da transmissão sináptica a longo prazo e microcirculação medular. O NO também pode ser responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica, como no caso de tumores (ZICHE e MORBIDELLI, 2000).

Neste enfoque, a produção de NO avaliada neste trabalho (Fig. 3) demonstrou menor produção pelas células dos animais com tumor, sendo maior a redução no Grupo 4 (animais com tumor e que receberam produto fermentado suplementado com cálcio). Quando comparamos os grupos controle (1,5 e 6) observamos uma alta produção de NO quando comparados com os grupos de tumor, sendo Grupo 2>Grupo 3>Grupo 4, tornando-se evidente a participação do produto fermentado e do produto fermentado com cálcio na contenção de formação de NO.

Foi hipotetizado, por Wang et al. (2000), que microvasos hepáticos regulam a apreensão e o destino de células metastáticas de câncer através da liberação de NO. Estes autores concluíram que existe um mecanismo de defesa natural contra metástases de câncer por meio do qual a apreensão de células tumorais no fígado induz a liberação de NO endógeno, levando à morte das células tumorais no sinusóide e reduzindo a formação de metástase hepática (FARIAS-EISNER et al., 1994).

Tem sido documentada a reação tumoricida *in vitro* de macrófagos como um mecanismo de defesa do hospedeiro para o controle e erradicação de doença neoplásica. Atualmente reconhece-se que macrófagos podem ser ativados e tornarem-se citotóxicos para células tumorais, incluindo células resistentes à morte por outros componentes do sistema de defesa do hospedeiro e drogas anti-câncer. Essa atividade dos macrófagos

sobre certas células tumorais pode ocorrer por meio de mecanismos dependentes da via óxido nítrico. O óxido nítrico possui uma variedade de atividades, podendo regular numerosas funções fisiológicas e apresentando um papel tumoricida. Atua diretamente nas células tumorais, inibindo sua respiração celular e, indiretamente, provocando danos ao DNA celular (QUEIROZ e BATISTA, 1999).

Por outro lado, Coussens e Werb em 2001 relacionaram o maior desenvolvimento do tumor à atividade de macrófagos, em consequência da exacerbação do processo inflamatório no micro-ambiente do tumor. O NO tem sido envolvido em mecanismos como a vasodilatação e inflamação, a expressão de NO em tumores sólidos e em suas metástases, sugerem que este mediador biológico possa participar da sobrevivência do tumor e de processos metastáticos (GAUTHIER, 2004).

A partir da inoculação de células de uma linhagem de adenocarcinoma de cólon em ratos, Lejeune et al. (1994) observaram que a imunossupressão dos linfócitos estava associada ao aumento na produção de NO por macrófagos esplênicos. Adicionalmente, cultura das células mononucleares esplênicas dos ratos portadores do tumor, quando tratada com um inibidor da síntese de NO fazia restaurar a capacidade proliferativa dos linfócitos. Os mesmos pesquisadores observaram também que durante a fase de crescimento do tumor, a expressão de RNAm para iNOS e a produção de NO estavam aumentadas. Este foi o primeiro trabalho a descrever o efeito do NO na imunossupressão induzida por tumores. Outros autores sugerem que a produção de NO pelas células de tumores poderia ser um dos mecanismos utilizados pelo tumor para se evadir das defesas do organismo (LEJEUNE et al., 1994; EDWARDS et al., 1996; DiNAPOLI et al., 1996; WINK et al., 1998).

A produção moderada de citocinas e NO induzidos por bactérias lácticas utilizadas na dieta pode apresentar um efeito benéfico na manutenção do balanço

imunológico e aumento da resistência à infecções, sem a indução de efeitos secundários que ocorrem em tratamentos onde somente se utilizam citocinas. Todavia, pode-se notar que altas concentrações de TNF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO causam caquexia, agressão tecidual, coagulação intravascular disseminada e choque. Portanto, o controle desses mediadores *in vivo* é muito importante, sendo que uma das vias de controle dos níveis ocorre através da seleção de cepas das bactérias lácticas apropriadas em estudos experimentais (PARK et al., 1999).

As citocinas estão envolvidas na regulação e disseminação de tumores. As células cancerígenas são capazes de produzir citocinas de forma contínua e promovem um ambiente favorável ao crescimento de tumores (NEGUS e BALKWILL, 1996).

Desde os anos 80, é de conhecimento que a regulação das citocinas deve ser firmemente controlada. Sabe-se, por exemplo, que o funcionamento do sistema imunológico é equilibrado pela atividade de mediadores pró e antiinflamatórios. A atividade não regulada desses mediadores pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias sérias (MANOLAGAS et al., 1994).

As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  atuam em conjunto como mediadores da resposta inflamatória e na imunidade inata. Tanto TNF- $\alpha$  quanto a IL-1 $\beta$  são citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos ativados. A IL-1 $\beta$  ativa os linfócitos e desempenha muitas funções importantes no início da resposta imune e na resolução de doenças, particularmente doenças inflamatórias e infecciosas.

A IL-1 é uma citocina pleiotrópica, também produzida pelos macrófagos, com inúmeras funções tanto no estado patológico quanto fisiológico como a produção e liberação de prostaglandinas, hormônios pituitários e colagenases; também estimula o sistema imune com o auxílio da produção de linfócitos (LEWIS et al., 2006). Existe um importante equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais da IL-1. Quando em altas



concentrações, possui impacto negativo nos sistemas vascular, endócrino, conectivo, imune, hematopoiético e nervoso central, representando um importante alvo terapêutico em um grande número de condições patológicas incluindo artrite reumatóide, aterosclerose, diabetes mellitus tipo I, e outras disordens auto imunes, doença de Alzheimer, leucemia e tumores sólidos (DINARELLO, 1991; DINARELLO e WOLFF, 1993).

No presente trabalho observamos uma produção desta citocina (diferença estatística não significativa) em todos os grupos testados, com ou sem tumor, demonstrando nenhuma influência do tratamento recebido (Fig. 4).

Estudos realizados na população oriental mostraram que pessoas que ingeriam uma dieta rica em ácidos poli-insaturados como, por exemplo, o ácido linoleico, que aparece em grande quantidade na soja, podiam suprimir a produção de IL-1 $\beta$ . Os mecanismos pelos quais ocorre a supressão na produção de IL-1 pelos ácidos insaturados ainda são desconhecidos, embora a supressão da produção possa estar envolvida com os eicosanóides (moléculas derivadas de ácido graxo) (JAMES et al., 2000).

A molécula de TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida preferencialmente pelos macrófagos e pode atuar como imunomoduladora, capaz de aumentar a expressão da resposta imune, promovendo maior expressão de antígenos de ativação em macrófagos e células endoteliais, aumentando a citotoxicidade, induzindo a liberação de IL-1 de células endoteliais e monócitos, estimulando a formação de radicais superóxido em neutrófilos (TRACEY et al., 1988).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina que foi caracterizada inicialmente como responsável pela necrose hemorrágica verificada em tumores. A identidade de TNF- $\alpha$  e caquexina uma vez estabelecida conduziram a uma ampla apreciação do fato de que esta molécula

poderia estar intimamente relacionada à patogênese de muitas doenças (CARSWELL et al., 1975).

Desde então, pesquisas têm indicado que quando a molécula de TNF- $\alpha$  é expressa localmente através de células do sistema imune, apresenta um perfil terapêutico. Entretanto, quando secretada de forma irregular na circulação, pode mediar uma ampla variedade de doenças, incluindo o câncer (AGGARWAL, 2003).

A molécula de TNF- $\alpha$  tem sido notificada como um dos principais mediadores da inflamação. É também produzida por tumores e pode agir no desenvolvimento de tumores endógenos (BALKWILL, 2002). O papel desta citocina está envolvido na tumorigênese, incluindo a transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase.

Neste sentido, nossos resultados mostram que a produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 5) foi elevada em todos os grupos testados. Ao compararmos os grupos com e sem tumor que receberam os mesmos tratamentos, apenas a ingestão do produto fermentado suplementado com cálcio apresentou diferença significativa na dosagem desse mediador sugerindo uma influência na sua produção.

Outra citocina envolvida em numerosas funções dentro do sistema imune é a IL-6. Crescentes evidências têm mostrado sua inclusão no desenvolvimento normal do epitélio intestinal (HURST et al., 2001; NAKA et al., 2002). É considerada um pirogênio endógeno, pois juntamente com a IL-1 e o TNF- $\alpha$ , induzem a um estado febril e à produção de proteínas de fase aguda, principalmente proteína C-reativa e proteína ligante de manose (MBP) (JANEWAY et al., 2001).

A produção de IL-6 ocorreu de forma diferente entre os animais com ou sem tumor (Fig. 6). Nos animais que não foram induzidos ao tumor (grupos controles) observou-se uma maior produção de IL-6 entre aqueles que receberam o tratamento com

o produto fermentado de soja, com ou sem adição de cálcio. Por outro lado, entre os animais induzidos quimicamente ao desenvolvimento do tumor, observamos uma menor produção desta citocina dentre aqueles que receberam os produtos fermentados, demonstrando uma modulação na administração desses produtos, sendo menor ainda naquele adicionado de cálcio (Grupo 4). O que nos chama a atenção é que nesses grupos com tumor e tratamentos com os produtos fermentados, os valores observados estão mais próximos daqueles encontrados no animal sadio, demonstrando possivelmente uma resposta normal quanto à produção dessa citocina. Embora a resposta ótima à infecção e lesão pareça ser mediada somente em presença da IL-6, sua importância relativa varia em cada caso, possivelmente como resultado da interação com outros mediadores também liberados (KISHIMOTO, 1989).

Estudos recentes de Becker et al. (2004) demonstraram que a IL-6 promove a hematopoiese e diferenciação terminal de células B assim como também uma potencial ação no câncer de cólon devido ao crescimento de células epiteliais cancerígenas *in vitro*. Nossos resultados demonstram que o produto fermentado de soja reduz a liberação de IL-6 sugerindo um efeito benéfico deste produto, levando provavelmente a uma redução do número de células cancerígenas. Entretanto os mecanismos imunológicos e moleculares dessa ação ainda não estão elucidados, sugerindo um aumento na formação de células cancerígenas de cólon de maneira dose-dependente à IL-6 (SCHNEIDER et al., 2000).

A resposta inflamatória pode ser ampliada por alguns componentes da imunidade adquirida, como anticorpos (resposta Th1) e células T (resposta Th2). Estes linfócitos podem liberar citocinas, implicando na ativação de macrófagos para destruir organismos estranhos (ERICKSON et al., 2000). O IFN- $\gamma$  é a principal citocina ativadora de macrófagos produzida pelas células T e possui funções essenciais na

imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células. Aumenta a ação microbicida de macrófagos pela estimulação da síntese de ERO e ERN.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstram maior produção de IFN- $\gamma$  pelas células dos animais induzidos quimicamente com tumor, sendo que dentre eles a menor produção foi observada naqueles que não receberam tratamento com o produto fermentado (Grupo 2) (Fig. 7). Isso sugere que nesses animais o tratamento com o produto fermentado de soja possa estar estimulando a produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez estimula os macrófagos a produzirem TNF- $\alpha$ , com conhecidas funções tumoricidas, numa tentativa do sistema imune em eliminar as células cancerígenas. As células dos animais que não foram induzidos ao tumor (Grupos 1, 5 e 6) apresentaram menor produção de IFN- $\gamma$  em relação aos animais com tumor. Em relação ao Grupo 4, os animais sem tumores (Grupo 6) tiveram menor produção de IFN- $\gamma$  pelo tratamento com o produto fermentado de soja suplementado com cálcio.

A IL-4 é uma citocina produzida por células T, subclasse Th2. Tem função imunomoduladora, induzindo complexo MHC de classes I e II a expressarem o antígeno, suprimindo IFN- $\gamma$  e induzindo a produção de iNOS através do estímulo de LPS (KAMBAYASHI et al., 1996). Seus efeitos biológicos no sistema imune incluem regulação do crescimento de células hematopoiéticas, células T, células B e também, a regulação da síntese de citocinas por células T ativadas (RAMIREZ et al., 1998).

Os resultados da produção de IL-4 (Fig. 8) demonstram uma maior produção desta citocina pelas células dos animais com tumor (Grupos 3 e 4), em relação aqueles na ausência deste (Grupos 5 e 6). Comparando-se os grupos com os mesmos tratamentos, produto fermentado com e sem tumor (Grupos 3 e 5), e produto fermentado suplementado com cálcio com e sem tumor (Grupos 4 e 6) observou-se que somente o produto fermentado de soja induziu maior produção desta citocina no grupo com tumor

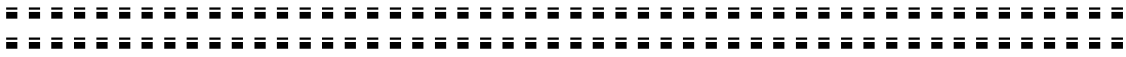
(Grupo 3), diferença essa significativa. Dessa forma, podemos sugerir que o cálcio não influencia a produção deste mediador e, conseqüentemente não induz uma resposta Th2.

A IL-4 é um dos mediadores que leva à liberação de altos níveis de IL-6, que por sua vez, é conhecida em regular receptores de IL-4 em camundongos (ROMANI, 1997). Deste modo, observamos um papel importante para a IL-4 no controle do crescimento de neoplasias. Nosso estudo, no entanto apresenta um perfil inverso da IL-4 frente a IL-6: quando essa se encontra elevada, a outra está em menor concentração, justamente naqueles grupos com tumor e que fizeram uso do produto fermentado, com ou sem adição de cálcio. O que poderia estar levando a essa resposta? A fermentação em si ou os produtos que se originam através da fermentação? Esses e outros aspectos poderão ser esclarecidos avaliando separadamente o produto fermentado como também os metabólitos presentes no processo de fermentação em um futuro estudo.

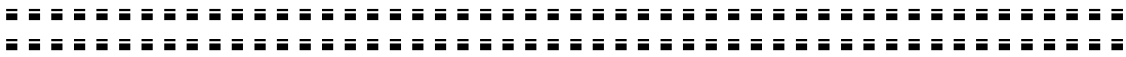
Por meio de verificações macroscópicas realizadas nos animais deste estudo (dados não mostrados), observamos que o tratamento com o produto fermentado de soja suplementado ou não com o cálcio levou a uma redução na incidência de tumores de 55,5%. Nos dois grupos de animais induzidos quimicamente ao tumor tratados com o produto fermentado de soja (Grupo 3) e com o produto fermentado de soja suplementado com o cálcio (Grupo 4), observou-se uma redução no número médio de tumores por animal, bem como no volume destes tumores. Sendo que nos animais que receberam o produto fermentado suplementado com o cálcio esta redução no número dos tumores e no volume dos tumores foi mais expressiva. Juntamente com os nossos resultados estes dados mostram que a ingestão do produto fermentado de soja, e mais ainda aquele suplementado com o cálcio, favorecem a resposta anti-tumoral, fato esse confirmado através de uma análise de correlação.

A análise de correlação encontra-se na Tabela 9. Observou-se que o Grupo 4 foi

o que apresentou um perfil mais próximo ao Grupo 1, sugerindo que o produto fermentado suplementado com cálcio seria o melhor tratamento. Quanto às demais correlações, as análises sugerem que a presença de tumor, bem como os diferentes tratamentos, pode modular de maneira diferente a produção dos mediadores analisados. No entanto, estudos adicionais precisam ser realizados para o entendimento destas correlações.



## *6. Conclusões*



Através dos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os animais induzidos quimicamente ao câncer de cólon que receberam o produto fermentado apresentaram uma maior produção de  $H_2O_2$  tal como observado nos animais saudáveis que receberam tratamento.

- A produção de NO assim como a IL-6 mostrou-se menor nos Grupos 3 e 4, evidenciando a importância tanto do produto fermentado como do produto fermentado suplementado com cálcio. Resultado inverso foi observado nos grupos de animais saudáveis que receberam tratamento.

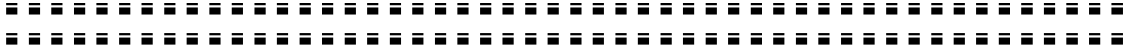
- Em relação a IL-1 $\beta$  observamos produção em todos os grupos testados, sem nenhuma influência do tratamento recebido.

- A maior produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ocorreu no Grupo 4, ou seja, mesmo induzidos ao tumor quimicamente conseguiram apresentar uma resposta preferencialmente tipo Th1.

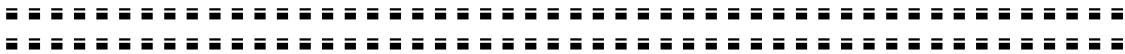
- Em relação a IL-4 observamos que o tratamento com o produto fermentado de soja (Grupo 3) induziu a uma maior produção desta citocina no animal portador do tumor, demonstrando uma participação de resposta Th2.

- A análise de correlação mostrou que o Grupo 4 apresentou um perfil mais próximo ao Grupo 1, sugerindo que o produto fermentado suplementado com cálcio seria o melhor tratamento e, portanto a resposta Th1 torna-se mais efetiva na contenção do tumor.





## *7. Referências Bibliográficas*



ABDUL, M.; HOOSEIN, N. Relationship of the interleukin-1 system with neuroendocrine and exocrine markers in human colon cancer cell lines. **Cytokine**, v.18, p. 86-91, 2002.

ADOLFSSON, O.; MEYDANI, S.N.; RUSSELL, R.M. Yogurt and gut function. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.80, p.245-56, 2004.

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat. Rev. Immunol.**, v.3, p.745–756, 2003.

ANDERSON, R.L.; WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **J. Nutr.**, v.125, p.581S-588S, 1995.

AYEBO, A.D.; SHAHANI, K.M.; DAM, R. Antitumor component(s) of yogurt: fractionation. **J. Dairy Sci.**, v.64, p.2318–23, 1981.

BALKWILL F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.13, p.135–141, 2002.

BARON, J.A.; BEACH, M.; MANDEL, J.S.; VAN STOLK, R.U.; HAILE, R.W.; SANDLER, R.S.; ROTHSTEIN, R.; SUMMERS, R.W.; SNOVER, D.C.; BECK, G.J.; BOND, J.H.; GREENBERG, E.R. Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p.101-107, 1999.

BECKER, C.; FANTINI, M.C.; SCHRAMM, C.; LEHR, H.A.; WIRTZ, S.; NIKOLAEV, A.; BURG, J.; STRAND, S.; KIESSLICH, R.; HUBER, S.; ITO, H.; NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; GALLE, P.R.; BLESSING, M.; ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M.F. TGF- $\beta$  suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity**, v.21, p.491-501, 2004.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p.1424-1437, 1996.

BENGMARK, S. Bacteria for optimal health. **Nutrition.**, v.16, p.611-615, 2000.

BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D; FRENGOVA, G.I.; SIMOV, Z.I.; ADILOV, E.F. Production of amino acids by yogurt bacteria. **Biotechnol. Prog.**, v.14, p.963-965, 1998.

BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: **Cytokines.** (Ed. Mire-Sluis, A.R.; Thorpe R.), San Diego: Academic Press, 1998. p.35-360.

BORRUEL, N.; CAROL, M.; CASELLAS, F.; M Antolín, M.; de Lara, F.; Espín, E.; Naval, J.; Guarner, F.; Malagelada, J.R. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. **Gut**, v. 51, p. 659-64, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução nº5, de 13 de Novembro de 2000. Oficializa os padrões de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 novembro 2000. Seção 1, p.9. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3285>. Acesso em: 17 maio 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Incidência de câncer no Brasil em estimativa 2005. Disponível em: [www.inca.gov.br/estimativa/2005](http://www.inca.gov.br/estimativa/2005). Acesso em: 18 abril 2005.

BROWN, N.S.; BICKNELL, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer, **Breast Cancer Res.**, v.3, p. 323-327, 2001.

BUTTERY, L.D.K.; SPRINGALL, D.R.; ANDRADE, S.P.; RIVEROS-MORENO, V.; HART, I.; PIPER, P.J.; POLKA, J.M. Induction of nitric oxide synthase in the neovasculature of experimental tumors in mice. **J. Pathol.**, v.171, p.311-19, 1993.

BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **Int. Dairy J.**, v.50, p.21-27, 1997.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.72, p.3666, 1975.

CASALE, T. B.; COSTA, J. J.; GALLI, S. J. TNF- $\alpha$  is important in human lung allergic reactions. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.15, p.35-44, 1996.

CHRISTOPHERSON, K.S.; BREDET, D. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. **J. Clin. Invest.**, v.100, p.2424-2429, 1997.

CLÉMENT, M.V.; PONTON, A.; PERVAIZ, S. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. **Febs Lett.**, v.27, p.13-8, 1998.

COLLINS, M.D.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, p.1052S-1057S, 1999.

CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. Survival of lactic bacteria in human stomach and adhesion to intestinal cells. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.1-12, 1987.

COTTON, F.A.; WILKINSON, G. Advanced Inorganic chemistry - A comprehensive text. **Wiley-Interscience**, 4<sup>th</sup> ed. New York, 1992, p.422-430.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.*, v.193, p.23-26, 2001.

DE ROOS, N.M.; KATAN, M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 71, p. 405-411, 2000.

DE SIMONE, C.; BIANCHI SALVADORI, B.; NEGRI, M.; FERRAZZI, M.; BALDINELLI, L.; VESELY, R. The adjuvant effect of yogurt on production of

gammainterferon by Con-A stimulated human peripheral blood lymphocytes. **Nutr. Rep. Int.**, v.33, p. 419-433, 1986.

DELMAS, P.D. Treatment of postmenopausal osteoporosis. **Lancet**, v.359, p. 2018-2026, 2002.

DINAPOLI, M.R.; CALDERON, C.L.; LOPEZ, D.M. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. **J. Exp. Med.**, v.183, p.1323-1329, 1996.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v.77, p.1627-1652, 1991.

DINARELLO, C.A; WOLFF, S.M. The role of interleukin-1 in disease. **N. Engl. J. Med.**, v.328, p.106-113, 1993.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 55, p. 1191-1308, 1981.

DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p.11-22, 2004.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and Advanced Cancer. **J. Pain Symptom Managem.**, v. 20, p. 214-232, 2000.

EDWARDS, P.; CENDAN, J.C.; TOPPING, D.B.; MOLDAWER, L.L.; MACKAY, S.; COPELAND, E.M.I.; LOND, D.S. Tumor cell nitric oxide inhibits cell growth in vitro, but stimulates tumorigenesis and lung metastasis in vivo. **J. Surg. Res.**, v.63, p.49-52, 1996.

ERICKSON, K. L.; MEDINA, E. A.; HUBBARD, N. H. Micronutrients and Innate Immunity. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.5-10, 2000.

ESKEW, M.L.; ZARKOWER, A.; SCHEUCHENZUBER, W.J.; BURGESS, J.R.; SCHOLZ, R.W.; HILDENBRANDT, G.R.; REDDY, C.C. Effects of inadequate vitamin E and/or selenium nutrition on the release of arachidonic acid metabolites in rat alveolar macrophages. **Prostaglandins**, v. 38, p. 79–89, 1989.

FARIAS-EISNER, R.; SHERMAN, M.P.; AEBERHARD, E.; CHAUDHURI, G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.91, p.9407-9411, 1994.

FELLSTRÖN, B.; ZEZINA, L. Apoptosis: friends or foe? **Transplantation Proc.**, v.33, p.2414-2416, 2001.

FIGUEIREDO, H.M.; PASSOS, F.J.V. Influence of the nitrogen source on the growth of *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20. **Sitientibus**, p. 37-50, 2003.

FILDER, I.J.; SCHROIT, A.J. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. **Biochim. Biophys. Acta**, v.948, p.151-173, 1998.

FISCHETTI, V.A. In: Gram-Positive Pathogens, Eds. FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R. P.; FERRETTI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J. I. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, 2000, p.11–24.

FISHBEIN, L. Multiple sources of dietary calcium- some aspects of its essentiality. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 39, p. 67-80, 2004.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.46, p.265-271, 2000.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v.166, p.S4-S8, 2002.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.** v.4, p.281-286, 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-378, 1989.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, p.439-442, 1991.

GAUTHIER, N. Tumor-derived and host-derived nitric oxide differentially regulate breast carcinoma metastasis to the lung. **Carcinogenesis**, v.25, p.1559-1565, 2004.

GANGOPADHYAY, A.; BAJENOVA, O.; KELLY, T.M.; THOMAS, P. Carcinoembryonic antigen induces cytokine expression in Kupffer cells: implications for hepatic metastasis from colorectal cancer. **Cancer Res.**, v. 56, p.4805-4810, 1996.

GARCIA-CARBONERO, R.; SUPKO, J.G.; Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. **Clin. Cancer Res.**, v.8, p. 641-661, 2002.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GILLILAND, S.E. Properties of Yogurt. In: Therapeutic Properties of Fermented Milks. Ed. R.K. Robinson, London: Elsevier Applied Science, 1991, p.75.

GIOVANNUCCI, E.; WILLETT, W.C. Dietary factors and risk of colon cancer. **Ann. Med.**, v. 26, p. 443-452, 1994.

GOLDBERG, I. In: Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. New York, Chapman & Hall Inc., cap. 9,14 e 20, 1994.

GOPAL, P.K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H.S. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their

antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 67, p. 207–216, 2001.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p.131-138,1982.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Lett.**, v.486, p.10-13, 2000.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v.18, p.685-716, 2001.

HALPERN, G.M.; VRUWINK, K.G.; VAN DE WATER, J.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Influence of long-term yogurt consumption in young adults. **Int. J. Immunother.**, v. 7, p. 205–210, 1991.

HAMPTON, M.B.; ORRENIUS, S. Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. **Toxicol. Lett.**, v. 28, p. 355-8, 1998.

HARTLEY, D.; DENARIAZ, G. The role of lactic acid bacteria in yogurt fermentation. **Int. J. Immunother.**, v. 9, p.3-17, 1993.

HEWITT, D.; BANCROFT, H.J. Nutritional value of yogurt. **J. Dairy Res.**, v. 52, p. 197–207, 1985.

HOLT, P. R. Studies of calcium in food supplements in humans. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 889, p. 128-137, 1999.

HOLZAPFEL, W.H.; WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in contemporary perspectiva. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. ed., *The Genera of Lactic acid bacteria*, v.2, Chapman & Hall, London, p. 1-6. 1995.



HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Res. Intern.**, v.35, p.109-116, 2002.

HURST, S.M.; WILKINSON, T.S.; MCLOUGHLIN, R.M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G.M.; TOPLEY, N.; JONES, S.A. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**, v.14, p. 705–714, 2001.

HYSLOP, P.A.; HINSHAW, D.B.; SCRAUFSTATTER, I.U.; COCHRANE, C.G.; KUNZ, S.; VOSBECK, K. Hydrogen peroxide as a potent bacteriostatic antibiotic: implications for host defense. **Free Radic Biol Med.**, v. 19, p. 31-37, 1995.

ISCHIROPOULOS, H.; ZHU, L.; CHEN, J.; TSAI, M.; MARTIN, J.C.; SMITH, C.D.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.298, p.431-437, 1992.

ITZKOWITZ, S.H.; HAPRAZ, N. Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 26, p.1634-48, 2004.

IULIANO-BURNS, S.; WANG, X.F.; EVANS, A.; BONJOUR, J.P.; SEEMAN, E. Skeletal benefits from calcium supplementation are limited in children with calcium intakes near 800 mg daily. **Osteoporos. Int.**, v.17, p.1794-1800, 2006.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v.59, p.533-547, 1995.

JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.343S–348S, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. Immunobiology the immune system in health and disease. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Garland Publ., 1997.

JANEWAY, C. A. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 7461-7468, 2001.

JENKINS, D.C.; CHARLES, I.G.; THOMSEN, L.L.; MOSS, D.W.; BAYLIS, S.A.; RHODES, P.; WESTMORE, K.; EMSON, P.C.; MONCADA, S. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.92, p.4392-4396, 1995.

KAMBAYASHI, T.; JACOB, C. O.; STRASSMANN, G. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. *Cell Immunol.*, v. 171, p. 153-158, 1996.

KAMPMAN, E.; SLATTERY, M.L.; CAAN, B.; POTTER, J.D. Calcium, vitamin D, sunshine exposure, dairy products and colon cancer risk (United States). **Cancer Causes Control**. v.11, p. 459-466, 2004.

KELLY J. Cytokines of the lung. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 765–788, 1990.

KENNEDY, A.R. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. **J. Nutr.**, v.125, p.733S-743S, 1995.

KINOUCI, F.L. "**Iogurte**" de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. 80f. 2006. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. *Blood*, v.74, p.1-10, 1989.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 123-131, 2003.

KLIGERMAN, J. Statistics on Cancer in Brazil in 2002. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 48, p. 175-179, 2002.

KROK, K.L.; LICHTENSTEIN, G.R. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 20, p. 43–48, 2004.

LAMPRECHT, S.A.; LIPKIN, M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, p.601–614, 2003.

LARSSON, S. C.; BERGKVIST, L.; RUTEGÅRD, J.; GIOVANNUCCI, E.; WOLK, A. Calcium and dairy food intakes are inversely associated with colorectal cancer risk in the Cohort of Swedish Men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, p.667–73, 2006.

LEJEUNE, P.; LAGADEC, P.; ONIER, N.; PINARD, D.; OHSHIMA, H.; JEANNIN, J.F.. Nitric oxide involvement in tumor-induced immunosuppression. **J. Immunol.**, v.152, p.5077- 5083, 1994.

LEVY, J. Immunonutrition: the pediatric experience. **Nutrition**, v.14, p.641-647, 1998.

LEWIS, A.M.; VARGHESE, S.; XU, H.; ALEXANDER, R. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. **J. Transl. Med.**, v.4, p.1-12, 2006.

LI, W.; LI, C.B. Lack of inhibitory effects of lactic acid bacteria on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumor. **World J. Gastroenterol.**, v.9, p.2469-2473, 2003.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, v.147, p.747–748, 1965.

LIN, J.; ZHANG, S.M.; COOK, N.R.; MANSON, J.E.; LEE, M.; BURING, J.E. Intakes of calcium and vitamin D and risk of colorectal cancer in women. **Am. J. Epidemiol.**, v.161, p. 755-764, 2005.

LIPKIN, M. Preclinical and early human studies of calcium and colon cancer prevention. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.889, p.120-127, 1999.

LIU, W.; REINMUTH, N.; STOELTZING, O.; PARIKH, A.; TELLEZ, C.; WILLIAMS, S.; JUNG, Y.D.; FAN, F.; TAKEDA, A.; AKAGI, M.; BAR-ELI, M.; GALLICK, G.E.; ELLIS, L.M. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 $\beta$  in

human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. **Cancer Res.**, v.63, p. 3632–3636, 2003.

LOPES-FARRÉ, A.; RODRÍGUEZ-FEO, J.A.; SÁNCHEZ DE MIGUEL, L.; RICO, L.; CASADO, S. Role of nitric oxide in the control of apoptosis in the microvasculature. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.30, p.1095-1106, 1998.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, v.11, p.1-17, 2001.

LUSTER, M.I.; GERMOLEC, D.R.; YOSHIDA, T.; KAYAMA, F.; THOMPSON, M. Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. **Hepatology**, v. 19, p.480–488, 1994.

MANOLAGAS, S.C.; Estrogen, cytokines and the pathophysiology of osteoporosis. In: KOHLER, P.O., ed. **Current Opinion in Endocrinology and Diabetes**. Philadelphia; Current Science, 1994. p.275-281.

MARKHATADZE, N. J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, v.59, p.571-579,1998.

MESSINA, M. Modern applications for an ancient bean: Soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. **J. Nutr.**, v.125, p.567S – 569S, 1995.

MESSINA, M.; BARNES, S. The role of soy products in reducing risk of cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.83, p.541-546, 1991.

METCHNIKOFF, O. Life of Elie Metchnikoff. Boston: Houghton Mifflin, 1921.

MIETTINEN, M.; VUOPIO-VARKILA, J.; VARKILA, K. Production of human tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 5403–5405, 1996.

MEYDANI, S. N.; HA, W.K. Immunologic effects of yogurt. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, p.861-72, 2000.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, v.9, p.1319-1330, 1995.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Eng. J. Med.**, v.329, p.2002-2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p.109-142, 1991.

MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p.829-39, 1994.

MOSMANN, T.R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, .H; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2348–57, 1986.

MOTULSKY; H.J. Analyzing Data with GraphPad Prism, 1999, GraphPad Software Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

MURTA, B.M.T.; MACHADO, J.S.; ZAPAROLI, M.; LARA, V.C. MURTA, E.F.C. The relationship of host immune cells, cytokine and nitric oxide production to tumor cells in ovarian carcinoma. **São Paulo Med. J.**, v.117, p.87-92, 1999.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res.**, v.4, p.233–242, 2002.

NATHAN, C.F. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. **J. Clin. Invest.**, v.80, p.1550-1560, 1987.

NATHAN, C.; HIBBS, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr. Opin. Immunol.**, v.3, p.65-70, 1991.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v.6, p.3051-3064, 1992.

NATHAN, N.C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v.78, p.915-918, 1994.

NEGUS, R.P.M.; BALKWILL, F.R. Cytokines in tumour growth, migration and metastasis. **World J. Urol.**, v.14, p.157-165, 1996.

NELSON, D.L.; COX, M.M. "Lehninger: principles of biochemistry", 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2004.

NEWMARK, H.L.; WARGOVICH, M.J.; BRUCE, W.R. Colon cancer and dietary fat, phosphate, and calcium: a hypothesis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.72, p.1323-1325, 1984.

NEWMARK, H.L.; WARGOVICH, M.J. Colon cancer and dietary fat, phosphorus, and calcium in Hawaiian-Japanese men. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.44, p.998-1000, 1986.

NICAISE, P.; GLEIZES, A.; FORESTIER, F.; QUERO, A.M.; LABARRE, C. Influence of intestinal bacterial flora on cytokine production by mouse peritoneal macrophage. **Eur. Cytokine New.**, v.4, p. 133-138, 1993.

NIELSEN, N.C. Structure of soy proteins. **New Proteins Food**, v.5, p.27-63, 1985.

O'SULLIVAN, C.; LEWIS, C.E. Tumor-associated leucocytes: Friends or foes in breast cancer carcinoma. **J. Path.**, v.172, p.229-235, 1994.

OPPENHEIM, J.J.; RUSCETTI, F.W.; FALTYNEK, C.R. Cytokines. In: STITES, D.P.; STOBO, J.D.; WELLS, J.V. Basic clinical immunology. 8. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. cap.9, p. 105-123.

PAIVA, A.M.R. **Efeito da ingestão de produtos derivados da soja na atividade anti-tumoral de macrófagos em câncer de mama experimental.** 98f. 2005. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

PARK, S.Y.; JI, G.E.; KO, Y.T.; JUNG, H.K.; USTUNOL, Z.; PESTKA, J.J. Potentiation of hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7 macrophage cell exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.46, p.231-41, 1999.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health**, v.29, p.4-8, 1974.

PARKER, S.L.; TONG, T.; BOLDEN, S.; WONG, P.A. Cancer Statistics 1996. **Cancer J. Clin.**, v.46, p.5-27, 1996.

PAUL, W.E. Interleukin-4: a prototype immunoregulatory lymphokine. **Blood**, v. 77, p. 1859-1870, 1991.

PERDIGON, G., NADER de MACIAS, M.E., ALVAREZ, S., MEDICI, M., OLIVEIRA, G. & PESCE de RUIZ HOLGADO, A. Effect of a mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* administered orally on the immune system in mice. **J. Food. Prot.**, v. 49, p.986-989, 1986.

PERDIGON, G., NADER de MACIAS, M.E., ALVAREZ, S., OLIVER, G. & PESCE de HOLGADO, A. Enhancement of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.**, v. 70, p. 919-926, 1987.

PERDIGON, G.; DE MACIAS, M.E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; DE RUIZ HOLGADO, A.A. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding

fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Immunology**, v. 63, p. 17–23, 1988.

PERDIGON, G.; FULLER, R.; RAYA, R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, v.2, p.27-42, 2001.

PETERS, R.K.; PIKE, M.C.; GARABRANT, D.; MACK, T.M. Diet and colon cancer in Los Angeles County, California. **Cancer Causes Control**, v.3, p.457-73, 1992.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for measurement of hydrogen peroxide by cells in culture. **J. Immun. Methods**, v.38, p.61-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid, microassay of measurement of superoxide and hydrogen products. **J. Immun. Methods**, v.46, p.211-226-, 1981.

PLATZ, E.A.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A.; RIMM, E.B.; SPIEGELMAN, D.; GIOVANNUCCI, E. Proportion of colon cancer risk that might be preventable in a cohort of middle-aged US men. **Cancer Causes Control.**, v.11, p.579– 588, 2000.

QUEIROZ, S.L.; BATISTA, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Quim. Nova**. v.22, p. 584-590, 1999.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.17, p.849-859, 2003.

RAMASARMA, T. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v.27, p.269-274, 1990.

RAMIREZ, F.; STUMBLES, P.; PUKLAVEC, D. M. Rat interleukin-4 assays. **J. Immunol. Methods**, v. 221, p.141-150, 1998.

REDDY, B.S.; RIVENSON, A. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3- methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. **Cancer Res.**, v.53, p.3914-3918, 1993.



ROBERFROID, M.B.; BORNET, F.; BOULEY, C.; CUMMINGS, J.H. Colonic microflora: nutrition and health. Summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, **Spain Nut Re**, v.53, p.127-30,1995.

ROCHELLE, L.G.; FISHER, B.M.; ADLER, K.B. Concurrent production of reactive oxygen and nitrogen species by airway epithelial cells in vitro. **Free Radic. Biol. Med.**, v.24, n.5, p.863-868, 1998.

ROMANI, L. The T cell response against fungal infections. **Clin. Op. Immunol.**, v.9, p.484-490, 1997.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I. Z.; PEI, Y. C.; VALDEZ, G. F. Development of a novel fermented soy milk product with potential probiotic properties. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 209, p. 305-307, 1999.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I. Z.; UEIJI, I.S.; SQUINZARI, M. M.; SILVA, S. I.; VADEZ, G. F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lipídeos séricos de coelhos hipercolesterlêmicos. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 74, p. 209-212, 2000.

ROSSI, E.A. **Desenvolvimento e avaliação biológica do potencial hipocolesterolêmico de um novo produto de soja**. 154f. 2000. Tese (livre Docente em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

ROSSI, E.A. Alimentos funcionais. In:DAMASO, A. Nutrição e exercícios na prevenção de doenças. Rio de Janeiro: MEDSI, p.337-362, 2001.

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M.G.; VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípidos séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.53, p.47-51, 2003.

RUBIN, P.; JOHNSTON, C.J.; WILLIAMS, J.P.; McDONALD, S.; FINKELSTEIN, J.N. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 33, p. 99–109, 1995.

SABOYA, L.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. Propriedades proliféricas e terapêuticas de leites fermentados. **Bol. SBCTA**, v.31, p. 176-185, 1997.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; ONNELA, T. Gut flora in normal and disordered states. **Chemotherapy**, v.41, p.5-15, 1995.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTON-RUAULT, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.**, v.80, p.S147-S171, 1998.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v.118, p.829-838, 1996.

SANDERS, M.E. Lactic acid bacteria as promoters of human health. In: GOLDBERG, I. Functional foods, Designer foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. New York: Chapman & Hall, p.294-322. 1994.

SANDERS, M.E. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. **J. Nutr.**, v.130, p.384-390, 2000.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, v.61, p.91-99, 2003.

SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V.; ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.191, p.503-508, 1993.

SCHAAFSMA, G.J.; DEKKER, P.R.; DE WARD, H. Nutritional aspects of yogurt. Bioavailability of essential minerals and trace elements. **Neth. Milk Dairy J.**, v.42, p.135–146, 1988.

SCHMIDT, H.H.H.W.; WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, p.919- 925, 1994.

SCHNEIDER, M.R.; HOEFLICH, A.; FISCHER, J.R.; WOLF, E.; SORDAT, B.; LAHM, H. Interleukin-6 stimulates clonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. **Cancer Lett.**, v.151, p.31–38, 2000.

SCHREZENENMEIR, J.; DEVRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:361S–64S, 2001.

SCREATON, G.; XU, X. T cell life and death signaling via TNF receptor family members. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 316-322, 2000.

SEDAS, V.T.; KUBIAK, K.N.W.; LOPEZ, G.R. Los probióticos y su futuro. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v.46, p. 6-10 1996.

SETCHELL, D.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human. **J. Nutr.**, v.129, p. 758S-767S, 1999.

SHACKELFORD, L.A.; RAO, D.R.; CHAWAN, C.B.; PULUSANI, S.R. Effect of feeding fermented milk on the incidence of chemically induced colon tumors in rats. **Nutr. Cancer**. v.5, p.159–64, 1983.

SHAHANI, K. M.; AYEBO, A. D. Role of dietary Lactobacilli in gastrointestinal microecology. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.33, p.2448-2457, 1980.

SHAMSUDDIN, A.M.; YANG, G.Y.; VUCENIK, I. Novel anti-cancer functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro. **Anticancer Res.**, v.16, p.3287-3292, 1996.

SIITONEN, S.; VAPAATALO, H.; SALMINEN, S.; GORDIN, A.; SAXELIN, M.; WIKBERG, R.; KIRKKOLA, A.L. Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. **Ann. Med.**, v.22, p.57-59, 1990.

SODINI, I.; REMEUF, F.; HADDAD, S.; CORRIEU, G. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v.44, p.113-37, 2004.

SOLIS-PEREYRA, B.; AATTOURI, N.; LEMONNIER, D. Role of food in the stimulation of cytokine production. **Am J Clin Nutr.**, v.66, p. 521S–525S, 1997.

SOUKOULIS, C.; PANAGIOTIDIS, P.; KOURELI, R.; TZIA, C. Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.2641-2654, 2007.

SOUZA, G.; VALLE, J.L.E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Bol. SBCTA**, v.34, p. 61-69, 2000.

SUNG, M.K.; KENDALL, C.W.; KOO M.M.; RAO, A.V. Effect of soybean saponins and gypsophilla saponin on growth and viability of colon carcinoma cells in culture. **Nutr. Cancer**, v.23, p.259-270, 1995.

SYK, I.; MANGELL, P.; BJARTELL, A.; JEPPSSON, B. Systemic Interleukin-6 Response to Colorectal Surgery Originates from the Bowel. **Dig. Surg.**, v.19, p.210–215, 2002.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN, C.F.; Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Res.**, v.51, p. 794–798, 1991.

TAMIME, A.Y.; DEETH, H.C. Yogurt: technology and biochemistry. **J. Food Protect.**, v.43, p.939-977, 1980.

TEJADA-SIMON, M.V., USTUNOL, Z. & PESTKA, J.J. Ex vivo effects of Lactobacilli, Streptococci and Bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. **J. Food Prot.**, v. 62, p. 162-169, 1999.

THOMPSON, D.C.; PORTER, S.E.; BAUER, A.K.; DAS, K.C.; OU, B.; DWYER-NIELD, L.; WHITE, C.W.; MALKINSON, A.M.. Cytokine-induced nitric oxide formation in normal but not in neoplastic murine lung epithelial cell lines. **Am. J. Physiol.**, v.274, p.L922-L932, 1998.

THOMSEN, L.L.; MILES, D.W.; HAPPERFIELD, L.; BOBROW, L.G.; KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **Br. J. Cancer**, v.72, p.41-44, 1995.

TOMERA, J.F. Yogurt: probiotic pharmacology. **Drugs Today**, v.32, p.539-551, 1996.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer, **FEBS Lett.** v.358, p. 1-3, 1995.

TRACEY, K.J.; LOWEY, S.F.; CERAMI, A. Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. **J. Infect. Dis.**, v.157, p.413-420, 1988.

TSUKAMOTO, T.; KUMANOTO, Y.; MIYAO, N.; MASUMORI, N.; TAKAHASHI, A.; YANASE, M.. Interleukin-6 in renal cell carcinoma. **J. Urol.**, v.148, p.1778-1782, 1992.

UMBELINO, D. C.; ROSSI, E.A.; CARDELLO, H.M.A.B.; LEPERA, J.S. Aspectos tecnológicos e sensoriais do “iogurte” de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.276-280, 2001.

VENDRAMINI, A.P. **Efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* na produção de citocinas, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio.** 96f. 2002. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

WALLACE, K.; BARON, J.A.; COLE, B.F.; SANDLER, R.S.; KARAGAS, M.R.; BEACH, M.A.; HAILE, R.W.; BURKE, C.A.; PEARSON, L.H. Effect of calcium supplementation on the risk of large bowel polyps. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.96, p.921-925, 2004.

WANG, H.H.; McINTOSH, A.R.; HASINOFF, B.B.; RECTOR, E.S.; AHMED, N.; NANCE, D.M.; ORR, F.W. B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: a natural hepatic defense against metastasis. **Cancer Res.**, v.60, p.5862-5869, 2000.

WANG, Y.C.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Antioxidante activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiol.** v.23, p.128-135, 2006.

WATER, J.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. The influence of chronic yogurt consumption on immunity. **J. Nutr.**, v.129, p. 1492S-1495S, 1999.

WEI, M.; MORIMURA, K.; WANIBUCHI, H.; SHEN, J.; DOI, K.; MITSUHASHI, M.; MOKU, M.; SALIM, E.I.; FAKUSHIMA, S. Chemopreventive effect of JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v.203, p.11-16, 2003.

WEIR, H.K.; THUN, M.J.; HANKEY, B.F.; RIES, L.A.; HOWE, H.L.; WINGO, P.A.; JEMAL, A.; WARD, E.; ANDERSON, R.N.; EDWARDS, B.K. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, p. 1276-1299, 2003.

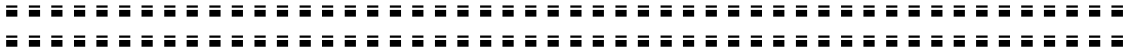
WENNMALM, A. Endotelial nitric oxide and cardiovascular disease. **J. Int. Med.**, v.235, p.317-327, 1994.

WINK, D.A.; VODOVOTZ, Y.; LAVAL, F.; DEWHIRST, M.W.; MITCHELL, J.B. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer. **Carcinogenesis**, v.19, n.5, p.711-721, 1998.

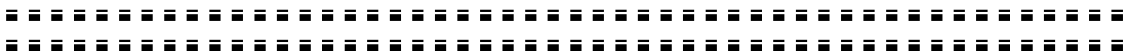
XIE, K.; HUANG, S.; DONG, X.; JUANG, S. H.; GUTMAN, M.; XIE, Q.; NATHAN, C.; FIDLER, I. J. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. **J. Exp. Med.**, v.181, p.1333-1343, 1995.

YASUKAWA, K.; TAKIDO, M.; MATSUMOTO, T.; TAKEUCHI, M.; NAKAGAWA, S. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. **Oncology**, v.48, p.72-76, 1991.

ZICHE, M.; MORBIDELLI, L. Nitric oxide and angiogenesis. **J. Neurooncol.**, v.50, p.139-148, 2000.



*8. Apêndice*





## 8.1. TABELAS

**Tabela 1:** Viabilidade das células do exsudato peritoneal (PEC) de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS (%)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (LPS)	86,25 ± 2,55 <sup>#</sup>	74,40 ± 0,38 <sup>#</sup>	90,12 ± 6,14 <sup>#</sup>	99,88 ± 0,08	92,67 ± 2,92 <sup>*</sup>	87,26 ± 4,51 <sup>#</sup>
Sem estímulo (RPMI-C)	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0	100 ± 0,0

Avaliação realizada após 24 horas de incubação. Cada valor representa a média ± desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\*  $p \leq 0,01$  quando comparado ao seu respectivo controle (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

#  $p \leq 0,001$  quando comparado ao seu respectivo controle (somente células) que equivale a 100% de viabilidade.

**Tabela 2:** Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (nmols/2x10 <sup>5</sup> células)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (Zim)	247,874 ± 96,359	326,142 ± 5,013	548,985 ± 18,142 <sup>#</sup>	311,005 ± 71,247 <sup>§</sup>	525,161 ± 67,987*	544,385 ± 13,529*
Sem estímulo (Tampão fosfato)	34,842 ± 8,137	39,282 ± 4,154	67,737 ± 5,116	36,246 ± 5,755	75,691 ± 10,899	71,478 ± 3,116

Cada valor representa a média ± desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\*p ≤ 0,001: em relação ao grupo 1

# p ≤ 0,001: em relação ao grupo 2

§ p ≤ 0,001: em relação ao grupo 6

**Tabela 3:** Produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

<b>PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (<math>\mu\text{mols}/5 \times 10^5</math> células)</b>						
<b>GRUPOS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Com estímulo (LPS)	174,504 $\pm$ 12,895	155,523 $\pm$ 16,627	101,684 $\pm$ 2,617 <sup>#</sup>	66,684 $\pm$ 7,165* <sup>≠</sup>	182,231 $\pm$ 0,393	175,227 $\pm$ 7,722
Sem estímulo (RPMI-C)	67,200 $\pm$ 8,388	84,697 $\pm$ 2,844	31,228 $\pm$ 3,258	24,111 $\pm$ 4,760	86,105 $\pm$ 3,664	89,007 $\pm$ 5,408

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\* $p \leq 0,001$ : em relação ao grupo 2

#  $p \leq 0,05$ : em relação ao grupo 5

≠  $p \leq 0,001$ : em relação ao grupo 6

**Tabela 4:** Concentração de IL-1 $\beta$  produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$ (pg/mL)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (LPS)	0,711 $\pm$ 0,053	0,680 $\pm$ 0,049	0,584 $\pm$ 0,144	0,6502 $\pm$ 0,212	0,551 $\pm$ 0,155	0,460 $\pm$ 0,162
Sem estímulo (RPMI-C)	0,420 $\pm$ 0,143	0,319 $\pm$ 0,178	0,478 $\pm$ 0,326	0,403 $\pm$ 0,044	0,336 $\pm$ 0,191	0,418 $\pm$ 0,132

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

**Tabela 5:** Concentração de TNF- $\alpha$  produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$ (pg/mL)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (LPS)	1853,310 $\pm$ 36,494	1927,946 $\pm$ 42,645	2040,480 $\pm$ 34,007 <sup>+</sup>	1922,198 $\pm$ 15,025 <sup>+#</sup>	1982,900 $\pm$ 30,412*	1813,140 $\pm$ 101,922*
Sem estímulo (RPMI-C)	900,554 $\pm$ 39,068	1031,80 $\pm$ 14,517	532,991 $\pm$ 53,445	510,438 $\pm$ 67,757	534,203 $\pm$ 79,927	540,332 $\pm$ 24,625

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\*p $\leq$ 0,001: em relação ao grupo 1

+ p $\leq$ 0,001: em relação ao grupo 2

# p $\leq$ 0,05: em relação ao grupo 6

**Tabela 6:** Concentração de IL-6 produzida nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

PRODUÇÃO DE IL-6 (pg/mL)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (LPS)	4159,960 ± 14,008	6471,765 ± 264,617	5313,190 ± 45,601 <sup>#&amp;</sup>	4775,55 ± 111,235 <sup>+\$</sup>	6594,135 ± 23,847*	7323,785 ± 130,754*
Sem estímulo (RPMI-C)	790,662 ± 34,735	1119,962 ± 70,049	372,090 ± 23,550	486,560 ± 42,809	395,602 ± 43,704	419,730 ± 50,593

Cada valor representa a média ± desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\*p≤0,001: em relação ao grupo 1

# p≤0,01: em relação ao grupo 2

+ p≤0,001: em relação ao grupo 2

& p≤0,001: em relação ao grupo 5

\$ p≤0,001: em relação ao grupo 6

**Tabela 7:** Concentração de IFN- $\gamma$  produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ (pg/mL)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (ConA)	1064,585 $\pm$ 30,497	1530,525 $\pm$ 71,823	1931,670 $\pm$ 31,063* +	2819,272 $\pm$ 282,798\$#	784,5 $\pm$ 179,251	517,5 $\pm$ 11,667
Sem estímulo (RPMI-C)	734,320 $\pm$ 53,362	590,126 $\pm$ 16,614	558,443 $\pm$ 74,323	812,797 $\pm$ 77,412	246,602 $\pm$ 28,564	450,890 $\pm$ 0,962

Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\*  $p \leq 0,01$ : em relação ao grupo 2

#  $p \leq 0,001$ : em relação ao grupo 2

+  $p \leq 0,001$ : em relação ao grupo 5

\$  $p \leq 0,001$ : em relação ao grupo 6

**Tabela 8:** Concentração de IL-4 produzida nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de ratos Wistar nos diferentes grupos de tratamento.

PRODUÇÃO DE IL-4 (pg/mL)						
GRUPOS	1	2	3	4	5	6
Com estímulo (ConA)	5,072 ± 0,607	7,604 ± 3,405	17,385 ± 6,461 <sup>*+</sup>	16,1125 ± 3,901 <sup>#</sup>	8,072 ± 1,415	8,312 ± 3,687
Sem estímulo (RPMI-C)	3,26442 ± 0,985	2,79564 ± 1,234	2,177 ± 0,426	4,11912 ± 0,547	2,05822 ± 0,338	4,85528 ± 0,158

Cada valor representa a média ± desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata.

\*p≤0,01: em relação ao grupo 2

# p≤0,05: em relação ao grupo 2

+ p≤0,01: em relação ao grupo 5



## 8.2. PREPARO DE SOLUÇÕES, REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

### 8.2.1. Meio RPMI-1640

Dissolver o conteúdo de um frasco em 1000 mL de água milli-Q.

Acrescentar:

HEPES.....2,38 g  
bicarbonato de sódio.....2 g

Ajustar o pH em 7,0-7,2. Em seguida, completar o volume para 1000mL e esterilizar utilizando membrana 0,22  $\mu$ m. Após esterilização, aliquotar o meio em frascos de 1000mL. Estocar sob refrigeração a 4°C.

No momento do uso, adicionar ao meio penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 U/mL), glutamina (2 mM), mercaptoetanol (50 mM) e 5% de soro fetal bovino.

### 8.2.2. Solução salina tamponada com fosfato (PBS)

*Solução 1:*

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O.....27,4 g  
água milli-Q q.s.p.....386 mL

*Solução 2:*

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . H<sub>2</sub>O.....7,88 g  
água milli-Q q.s.p.....114 mL

*Solução estoque:* preparar, inicialmente, as soluções 1 e 2. Em seguida, misturar as duas soluções e completar o volume para 1000 mL com água milli-Q e autoclavar. O pH deve ser de 7.2. Armazenar sob refrigeração (4 °C).

*Solução de uso:*

solução estoque.....40 mL  
NaCl.....8,5 g  
água milli-Q q.s.p.....1000 mL

Ajustar o pH, se necessário, e autoclavar. Armazenar sob refrigeração (4°C).

### 8.2.3. Tampão fosfato de potássio

fosfato dissódico anidro.....	11,46 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O.....	21,57 g
fosfato monopotássio.....	2,65 g
água destilada q.s.p.....	1000 mL

acertar o pH em 7,2.

### 8.2.4. Reagente de Griess

sulfanilamida.....	1,0 g
naftietilenodiamina.....	0,1 g
ácido orto-fosfórico.....	2,5 mL
água milli-Q q.s.p.....	100 mL

Dissolver a sulfanilamida e naftietilenodiamina. Acrescentar, aos poucos, o ácido orto-fosfórico. Completar o volume para 100mL. Manter o reagente sob refrigeração (4 °C). Proteger da luz.

### 8.2.5. Peroxidase

Pesar 1 mg de peroxidase e adicionar em 1mL de tampão fosfato. Aliquotar e armazenar a -20 °C.

### 8.2.6. Líquido de Lázarus

violeta genciana 1%.....	2 mL
ácido acético glacial.....	3 mL
água destilada q.s.p.....	100 mL

### 8.2.7. Tioglicolato 3%

Colocar 3 g do meio em 100mL de água destilada. Distribuir em tubos e autoclavar.

### 8.2.8. Solução de LPS

Dissolver 1 mg de LPS em 1 mL de meio RPMI, esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e armazenar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente diluir para a concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ , utilizando RPMI-1640.

### 8.2.9. Solução de MTT – tetrazólio

Preparar solução estoque de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio) a 5 mg/mL em PBS. Esterilizar por filtração utilizando membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Guardar sob refrigeração a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e protegida da luz. No momento do uso, diluir a solução estoque em RPMI sem soro fetal para a concentração de 1 mg/mL.

### 8.2.10. Teste imunoenzimático ELISA de captura

As soluções preparadas para a realização do ELISA estão descritas a seguir:

#### Carbonato de sódio 0,1 M

NaHCO <sub>3</sub> .....	8,40 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	3,56 g

#### PBS\*

NaCl.....	80 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	11,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2,0 g
KCl.....	2,0 g
água milli-Q q.s.p.....	10 L

Acertar o pH em 7.0

#### Diluyente de ensaio

PBS\* com 10% de soro fetal bovino.

Tampão de lavagem

PBS\* com 0,05% de Tween 20

# Capítulo 2

<b>De:</b>	"Immunobiology" <esubmissionsupport@elsevier.com>
<b>Para:</b>	fernandabenzatti@yahoo.com.br
<b>Assunto:</b>	Submission Confirmation
<b>Data:</b>	Sat, 18 Aug 2007 21:41:37 +0100

Dear Master Fernanda Paulin Benzatti,

Your submission entitled "INFLUENCE OF FERMENTED SOY PRODUCT IN THE IMMUNE SYSTEM OF RATS WITH COLON CANCER" has been received by Immunobiology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/imbio/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Immunobiology

## INFLUENCE OF FERMENTED SOY PRODUCT IN THE IMMUNE SYSTEM OF RATS WITH COLON CANCER

**Fernanda Paulin Benzatti<sup>1</sup>; Kátia Sivieri<sup>2</sup>; Elizeu Antonio Rossi<sup>2</sup>; Iracilda Zeppone Carlos<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

<sup>2</sup>Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

### Adress for correspondence:

I. Z. Carlos  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/Araraquara  
Rua Expedicionários do Brasil, 1621.  
14801-902 – Araraquara - São Paulo, Brasil.  
e-mail: carlosiz@fcar.unesp.br

**KEY WORDS:** colon cancer, cytokines, hydrogen peroxide, macrophages, nitric oxide, soy product.

### LIST OF ABBREVIATIONS USED IN THE PAPER:

°C: celsius degrees  
 µg: microgram  
 Con-A: Concanavalin-A  
 DMH: 1,2 dimethylhydrazine  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxide hydrogen  
 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: phosphoric acid  
 ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*  
 IFN-γ: interferon-γ  
 IL: interleukin  
 Kg: kilogram  
 LAB: Lactic acid bacteria  
 M: molar  
 mg: milligram  
 mL: mililitre  
 mmol: millimol  
 N: normal  
 NaCl: sodium cloret  
 NaOH: milligram  
 nm: nanomol  
 NO: nitric oxide  
 NOS: nitric oxide synthetase  
 PBS: phosphate buffer sodium  
 PEC: peritoneal exsudate cells  
 pg: picograms  
 RPMI: *Roswell Park Memorial Institute* (culture medium)  
 RNI: reactive nitrogen intermediates  
 ROI: reactive oxygen intermediates  
 TNF-α: tumor necrosis factor-α  
 UNISOJA: Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja

## ABSTRACT

Colorectal cancer is one of the most common fatal malignancies worldwide. Combined the macrophages performance, the consumption of products derived from soy is being very spread now, could reduce the risk certain diseases, including tumors. LAB is utilized in probiotic food and can promote a stimulation of immune system influencing through the increase of the pathogen phagocytosis and also the cytokines production. The purpose of the present work was evaluated the immune response in the development of colon cancer induced chemically with DMH in rats that received fermented soy product with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416; which were supplemented or not with calcium. In the different animals groups the immunological activity was evaluated through production of mediators such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4. Results demonstrate that in presence of tumor and fermented product there is a higher immune system stimulation observed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, as well as the animals without tumor and that received soy treatment. In the animals with tumors that received the fermented soy product treatment and supplemented with calcium was observed smaller production of NO and IL-6. In relation to TNF- $\alpha$ , we observed production in all tested groups, with no influence of treatment received. In relation to IFN- $\gamma$  the highest production was in the animals with tumor that received the fermented product supplemented with calcium. As for IL-4, the treatment with fermented soy product induced a higher production of this cytokine in the animal with tumor, demonstrating a Th2 response. So, through correlation analyses, we suggested that soy fermented product supplemented with calcium would be the best treatment and, Th1 response becomes more effective in tumor contention.

## INTRODUCTION

Colorectal cancer is one of the most common fatal malignancies worldwide and affects men and women equally (Weir et al., 2003). Most cases of colorectal cancer are sporadic, and genetic and environmental factors are important. About 20% of all patients with this cancer are estimated to have some component of familial risk without fulfilling the strict criteria for hereditary colorectal cancer. Family history should therefore always be taken when assessing a patient (Lynch and De La Chapelle, 2003). Immune system is responsible for the organism defense against pathogenic substances and some tumors that unchain a specific immune response in the attempt of suppressing its growth. Combined the macrophages performance, the consumption of products derived from soy is being very spread now, could reduce the risk certain diseases, including tumors, improving health condition. Probiotics are defined as “living microorganisms which upon ingestion in certain numbers exert health benefits beyond inherent basic nutrition”, the best known are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Streptococcus* spp., which collaborate synergistically in yogurt and are widely used as major starter bacteria for the production of yogurt (Schaafsma, 1996). Several lines of evidence have established the benefits



of certain probiotics to reduce signs and symptoms of lactose intolerance, prevention and treatment of certain diarrhoeal diseases, reduction of bacterial enzyme activities and stimulation of the immune system (Sanders, 1993). One of the most significant groups of probiotic organisms are the lactic acid bacteria (LAB). In the finished product, the LAB must be alive and in substantial amounts. LABs have been used for thousands of years to produce fermented food and milk products. Fermented products contain a variety of fermenting microorganisms belonging to various genera and species, all of which produce lactic acid. LAB plays an important role in retarding colon carcinogenesis by possibly influencing metabolic, immunologic, and protective functions in the colon (Roberfroid et al., 1995) The best microorganisms known are *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Streptococcus* spp., which collaborate synergistically in yogurt and are widely used as major starter bacteria for the production of yogurt (Gopal et al., 2001; Radke-Mitchell and Sandine, 1986; Siitonen et al., 1990). Our work study *Enterococcus* and *Lactobacillus* generas, where the association between *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416 presenting technologic and sensorial properties similar to the traditional fermented products. Yogurt is one of the best-known of the foods that contain probiotics. Yogurt is defined by the *Codex Alimentarius* of 1992 as a coagulated milk product that results from the fermentation of lactic acid in milk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* (Meydani and Ha, 2000). Soy yoghurt is a functional food obtained through soy milk fermented by living microorganisms (Beskhova et al., 1998). Soy foods fit the dietary guidelines for reducing cancer risk, and they also contain anticarcinogens which may prove to be protective. In spite of present analogous nutritionally characteristic to fermented milk products, soy yoghurt possess smaller quantities of calcium (Umbelino et al., 2001). Evidence from animal studies has suggested that high calcium intake may reduce colonic carcinogenesis. In humans, calcium supplements have been shown to reduce colonic epithelial cell proliferation and risk of recurrent colorectal adenomas, and low-fat dairy foods reduce proliferation and normalize differentiation of colonic epithelial cells. By this way, we make use of a fermented soy product supplemented with calcium to prevent the development of colon tumor (Holt, 1999). Macrophages play an

important role in the innate immune response. These cells represent one of the first lines of nonspecific defense against bacterial invasion (Fujiwara and Kobayashi, 2005). In every stage of the immune response macrophages are involved and they can release many compounds such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and nitric oxide (NO).  $H_2O_2$  plays a variety of diverse roles in the body. It acts as a signaling molecule, an intermediate in metabolism, a cytotoxic agent in host defence, and a cytotoxic agent in pathology (Abe e Berk, 1999; Halliwell et al., 2000; Samali et al., 1999). NO is a highly molecule produced from L-arginine in a reaction catalysed a family of nitric oxide synthetase (NOS) enzymes (Croen, 1993; MacMicking et al., 1997). Another important macrophage function that has been studied with regard to micronutrient effects is the production of cytokines (Erickson et al., 2000). Cytokines are a diverse group of peptide molecules that regulate cell and tissue functions (Fridman and Tartour, 1997). In our work we studied TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4. The purpose of the present work was evaluated the immune response in the development of colon cancer induced chemically with 1,2 dimethylhydrazine (DMH) in rats that received fermented soy product with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416; which were supplemented or not with calcium.

## **MATERIAL AND METHODS**

### Animals

A total of 30 adult male Wistar rats weighing approximately 90 grams were acquired from the Animal House of the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Araraquara (UNESP). The rats were separated into six experimental groups: 1) Negative control: healthy animals didn't received fermented product; 2) Positive control: rats induced with colon cancer didn't received fermented product; 3) Cancer yogurt group: rats induced with colon cancer were fed with fermented product; 4) Cancer calcium group: rats were fed with fermented yogurt supplemented with calcium; 5) Healthy yogurt group: healthy rats were fed with fermented yogurt; 6) Healthy calcium group: healthy rats were fed with fermented yogurt supplemented with calcium.

### Preparation and administration of soy product

Fermented soy product was prepared in UNISOJA of Pharmaceutical Sciences of Araraquara (UNESP) and fermented with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416 (Rossi et al., 2000). Fermented soy product supplement with calcium was produced through fermented product improved with 600mg calcium/L (Umbelino et al., 2001).

### Inducing tumor

Colon cancer was induced chemically with 1,2 dimethylhydrazine (DMH) through gavage technique, in proportion of 3 mL/Kg by weight/day, once a week.

### Peritoneal macrophages

Thioglycollate-elicited peritoneal exsudate cells (PEC) were harvested from Wistar rats using 5.0 mL of PBS, pH 7.4. The cells were washed twice by centrifugation at 200 g during 5 minutes at 4 °C and re-suspended in RPMI-1640 medium with 100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin,  $5 \cdot 10^{-2}$  M mercaptoethanol and 5% inactivated fetal calf serum. The adherent cells were obtained by incubation for 1 hour at 37°C in an atmosphere of air/CO<sub>2</sub> (95:5, v/v) and incubated with LPS or RPMI-1640 medium.

### Splenic cells

The spleens were collected aseptically and placed on a Petri dish containing 3,0 mL RPMI-1640 medium. The cell suspension was obtained by tweezing the spleen and washing three times with RPMI-1640. The cells were resuspended to a concentration of  $5 \times 10^6$  cell/mL of RPMI-1640 medium and cultivated with Concanavalin-A (Con-A) or RPMI-1640 medium.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay

PEC ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were suspended in a solution containing 140mmol NaCl, 10 mmol potassium phosphate buffer (pH 7.0), 5.5mmol dextrose, 0.56 mmol phenol red, and 0.01mg/mL type II horseradish peroxidase. Next 100µL of this suspension was added to each of the wells of

a 96-well flat-bottom tissue culture plate and exposed to 50 $\mu$ L of suspension. A solution of zymosan was used as a positive control. The cells were incubated for 1h. The reaction was stopped with 10 $\mu$ L of 4N NaOH and the absorbance of the samples were read at 620nm with a Multiskan Ascent ELISA reader against a blank containing phenol red solution and 4N NaOH. The results were expressed as nanomols of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/2x10<sup>5</sup> peritoneal cells, from a standard curve established in each test consisting of known molar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in buffered phenol red (Pick and Mizel, 1981)

#### Nitric oxide assay

Nitric oxide synthesis was determined by assaying culture supernatants for nitrite, the stable reaction product of NO and molecular oxygen. Nitrite concentration was determined by the Griess reaction. Briefly, 50  $\mu$ L of culture supernatants were incubated with equal volumes of the Griess reagent (1% sulfanilamide, 0,1% N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) at room temperature for 10 minutes and absorbance (540 nm) was determined in a Multiskan Ascent ELISA reader. The results were reported as  $\mu$ mols NO/5x10<sup>5</sup> peritoneal cells quantified from the standard curve (Green, 1982).

#### Determination of IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ and IL-4

The cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 release in the supernatant of macrophage cell culture and the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-4 released in the supernatant of splenic cell culture were quantified by ELISA. The ELISA kit (Kit BD OptEIA<sup>®</sup>), using recombinant rat TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4 as standard, was used to measure respectively TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-4 secretion in culture supernatants following the manufactures instructions.

#### Statistical analysis

The data showing normal distribution and parametric tests was utilized in the analysis like: ANOVA following Tukey test to compares the different groups and Pearson test in correlation

analysis among the different mediators. All analyses were made using the Prism Program (GraphPad Prism Software, San Diego, CA).

## **RESULTS**

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO production

When we compares H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (Fig. 1) among controls groups (1, 5 e 6) it's observed smaller production in Group 1. Among the animals with tumor (Groups 2, 3 and 4) we observed higher production in Group 3, where the animals were treated with fermented product without supplementation. In NO production (Fig. 1) we observed smaller production in animals cells with tumor, being larger the reduction in the Group 4. When we compare controls groups (1, 5 and 6) we notice a higher NO production compare with tumor groups, like, Group 2>Group 3>Group 4, becoming evident the participation of the fermented product and the product fermented with calcium in the contention of formation of NO.

### **Insert Fig. 1**

### TNF- $\alpha$ production

TNF- $\alpha$  production was high in all of the tested groups. Comparing the groups with and without tumor that received the same treatments, just the ingestion of fermented soy product supplemented with calcium presented significant difference in the dosage of this mediator (Fig. 2).

### **Insert Fig. 2**

### IL-6 production

In animals not induced to the tumor (controls groups) a larger IL-6 production was observed among those that received the treatment with the fermented soy product, with or without addition of calcium. On the other hand, among the animals induced chemically with colon tumor, we observed a smaller production of this cytokine in one that received the fermented

products, demonstrating a modulation in the administration of those products, being smaller still in that added of calcium (Group 4) (Fig. 3).

**Insert Fig. 3**

IFN- $\gamma$  production

IFN- $\gamma$  production was higher by animals cells induced chemically with tumor, and smaller production was observed in those that didn't receive treatment with the fermented product (Group 2) suggesting that in those animals the treatment with fermented soy product can be stimulating the production of IFN- $\gamma$ . Animals' cells not induced to the tumor (Groups 1, 5 and 6) present smaller IFN- $\gamma$  production in relation to animals with tumor (Fig. 4).

**Insert Fig. 4**

IL-4 production

IL-4 production was a higher in the animals cells with tumor (Groups 3 and 4), in relationship those in the absence of this (Groups 5 and 6). When we compares groups with the same treatments, fermented product with and without tumor (Groups 3 and 5), and fermented product supplemented with calcium with and without tumor (Groups 4 and 6) it was observed that only the fermented soy product induced higher production of this cytokine in the Group 3 (with tumor) (Fig. 5). In that way, we can suggest that calcium doesn't influence this mediator production and, consequently it doesn't induce a Th2 response.

**Insert Fig. 5**

Correlation analysis

The table 1 shows a correlation analyses among different mediators in each group studied.

**Insert Table 1**

**DISCUSSION**

Macrophages produce and release numerous secretory products including several cytokines, inorganic reactive radicals, reactive oxygen intermediates (ROI) and reactive nitrogen intermediates (RNI), all having biological activity (Forman and Torres, 2001).  $H_2O_2$  and NO are important in cell signaling and are effector molecules for the microbicidal and cytotoxic response of macrophages after stimulation (Kayser et al., 2000). Lower  $H_2O_2$  production in Group 1 demonstrates that ingestion of fermented soy product or supplemented or not with calcium stimulates higher production of this molecule. Wherever higher production in Group 3 suggests that the calcium in tumor presence reduce the production of this mediator may be reflecting in smaller aggression in adjacent cells (Ramasarma, 1990). Analyzing our results, we notice that animals induced chemically to colon cancer and that received fermented product presented a higher  $H_2O_2$  production just like observed in the healthy animals that received treatment. NO and IL-6 production shown smaller in Groups 3 and 4, evidencing the importance so much of fermented product as of the fermented product supplemented with calcium. Inverse result was observed in groups of healthy animals that received treatment. It was important observe in IL-6 production that groups with tumor and treated with fermented products, the values are closer than healthy animals, demonstrating a normal response for the production of this cytokine. Although the great response to the infection and lesion seems to be mediated just in presence of IL-6, its importance is result of interaction with other mediators also liberated (Kishimoto, 1989). TNF- $\alpha$  acts as mediator of inflammatory response and in innate immunity; it's a pro-inflammatory cytokine produced by activated macrophages. In relation TNF- $\alpha$ , we observed high production in all of tested groups; just the ingestion of fermented soy product supplemented with calcium present a significant TNF- $\alpha$  production, however without any influence of the received treatment. Inflammatory response can be applied by some components of acquired immunity, as antibodies (Th1 response) and T cells (Th2 response). These lymphocytes can liberate cytokines, implicating in macrophages activation to destroy antigens (Erickson et al., 2000). Th1 response may be mediated by pro-inflammatory cytokines with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Th2 response is mainly characterized by IL-4 (Kovalovsky et al., 2000). IFN- $\gamma$  is the main cytokine activation of macrophages produced by T cells and it possesses essential

functions in innate immunity and in adaptive immunity mediated by cells. It increases macrophages microbicide action to stimulate ROI and RNI synthesis. Higher production of IFN- $\gamma$  occur in Group 4, suggesting that even induced chemically to tumor they present a Th1 response. IL-4 is a cytokine with immunomodulatory function produced by T cells, subclass Th2 (Kambayashi et al., 1996). Their biological effects in immune system include regulation of hematopoietic cells growth, T and B cells and also, the regulation of cytokines synthesis by T cells activated (Ramirez et al., 1998). In relation to IL-4 we observed that treatment with the fermented soy product (Group 3) induced a higher production of this cytokine in animal with tumor, demonstrating a Th2 response. Results suggest that ingestion of fermented soy product, and still more with fermented soy product supplemented with calcium, favor anti-tumoral response, fact confirmed through a correlation analysis. This can be observed in Group 4 that presented nearest profile to Group 1, suggesting that fermented product supplemented with calcium would be the best treatment and, therefore Th1 response becomes more effective in tumor contention. As for the other correlations, the analyses suggest that in tumor presence, as well as the different treatments, it can modulate in a different way the production of analyzed mediators. However, additional studies need to be accomplished for the understanding of these correlations.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by CAPEs.

#### **REFERENCES**

- Abe, J., Berk, B.C., 1999. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 274, 21003- 21010.
- Beskhova, D.M., Simova, E.D, Frengova, G.I., Simov, Z.I., Adilov, E.F, 1998. Production of amino acids by yogurt bacteria. *Biotechnol. Prog.* 14, 963–965.
- Croen, K.D., 1993. Evidence for an antiviral effect of nitric oxide-inhibition of herpes-simplex virus type-1 replication. *J. Clin. Invest.* 91, 2446–2452.



- Erickson, K. L., Medina, E. A., Hubbard, N. H., 2000. Micronutrients and innate immunity. *J. Infect. Dis.* 182, 5-10.
- Forman, H. J., Torres, M., 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, S4-S8.
- Fridman, W.H., Tartour E., 1997. The use of cytokines in the treatment of solid tumours. *Haematol Cell Ther.* 39, 105-108.
- Fujiwara, N., Kobayashi, K. 2005. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy.* 4, 281-286.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S. 2001. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food. Microbiol.* 67, 207-216.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>n] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131-138.
- Halliwell, B., Clement, M. V., Long, L. H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *Febs Lett.* 486, 10-13.
- Holt, P. R. 1999. Studies of calcium in food supplements in humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 889, 128-137.
- Kayser, O., Kolodziej, H., Kiderlen, A.F. 2000. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. *Phytotherapy Research.* 15, 122-126.
- Kambayashi, T., Jacob, C. O., Strassmann, G. 1996. IL-4 and IL-13 modulate IL-10 release in endotoxin-stimulated murine peritoneal mononuclear phagocytes. *Cell Immunol.* 171, 153-158.
- Kishimoto, T. 1989. The biology of interleukin-6. *Blood.* 74, 1-10.
- Kovalovsky, D., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E. 2000. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *J. Neuroimmunol.* 109, 23-29.
- Lynch, H.T., De La Chapelle, A. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932.

- MacMicking, J.D., Nathan, C., Hom, G., Chartrain, N., Fletcher, D.S., Trumbauer, M., Stevens, K., Xie, Q.W., Sokol, K., Hutchinson, N., Chen, H., Mudgett, J.S., 1995. Altered Responses To Bacterial-Infection And Endotoxic Shock In Mice Lacking Inducible Nitric-Oxide Synthase. *Cell*. 81, 641–650.
- Meydani, S. N., Ha, W.K. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 861-72.
- Pick, E., Mizel, D. J. 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*. 46, 211-226.
- Radke-Mitchell, L.C., Sandine W.E. 1986. influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 9, 2558–2568.
- Ramasarma, T. 1990. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has a role in cellular regulation. *Indian J. Biochem. Biophys.* 27, 269-274.
- Ramirez, F., Stumbles, P., Puklavec, D. M. 1998. Rat interleukin-4 assays. *J. Immunol. Methods*. 221, 141-150.
- Roberfroid, M.B., Bornet, F., Bouley, C., Cummings, J.H. 1995. Colonic microflora: nutrition and health. summary and conclusions of an International Life Sciences Institute (ILSI) [Europe] workshop held in Barcelona, Spain. *Nutr. Rev.* 53, 127–30.
- Rossi, E. A., Vendramini, R. C., Carlos, I. Z., Ueiji, I.S., Squinzari, M. M., Silva, S. I., Vadez, G. F. 2000. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lipídeos séricos de coelhos hipercolesterlêmicos. *Arq. Bras. Cardiol.* 74, 209-212.
- Samali, A., Nordgren, H., Zhivotovsky, B., Peterson, E., Orrenius, S. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 6-11.
- Sanders, M.E. 1993. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: significance to fluid milk products containing cultures. *J Dairy Sci.* 76, 1819-1828.

- Schaafsma, G. 1996. State Of the art concerning probiotic strains in milk products. IDF Nutr. Newslet. 5,23- 24.
- Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S., Gordin, A., Saxelin, M., Wikberg, R., Kirkkola, A.L. 1990. Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. Ann. Med.22, 57–59.
- Umbelino, D. C., Rossi, E.A., Cardello, H.M.A.B., Lepera, J.S. 2001. Aspectos tecnológicos e sensoriais do “iogurte” de soja enriquecido com cálcio. Ciência e tecnologia de alimentos. 21, 276-280.
- Weir, H.K., Thun, M.J., Hankey, B.F., Ries, L.A., Howe, H.L., Wingo, P.A., Jemal, A., Ward, E., Anderson, R.N., Edwards, B.K. 2003. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. J. Natl. Cancer Inst. 95, 1276–1299.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1:** Hydrogen peroxide and nitric oxide production by peritoneal macrophages culture. Peritoneal exsudate cells were tested in presence of zymosan and LPS for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO assays. Data are reported as the mean  $\pm$  SD for at least five independent experiments carried out triplicate. ANOVA following Tukey test was used to compares the different groups. The significance of the differences between different groups in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was: \*p $\leq$  0,001: compared to Group 1, #p $\leq$ 0,001: compared to Group 2, §p $\leq$  0,001: compared to Group 6, +p $\leq$ 0,001: compared to Group 4. The significance of the differences between different groups in NO production was: \*p $\leq$  0,001: compared to Group 2, #p $\leq$  0,05: compared to Group 5, =p $\leq$  0,001: compared to Group 6, +p $\leq$ 0,01: compared to Group 4.

**Fig. 2: TNF- $\alpha$  production in peritoneal macrophage cultures.** Peritoneal exsudate cells were cultivated in presence of LPS. Data are reported as the mean  $\pm$  SD for at least five independent experiments carried out triplicate. ANOVA following Tukey test was used to compares the different groups. The significance of the differences between different groups production was: \*p $\leq$  0,001: compared to Group 1, +p $\leq$  0,001: compared to Group 2, #p $\leq$  0,05: compared to Group 6, &p $\leq$ 0,01: compared to Group 6.

**Fig. 3: IL-6 production in peritoneal macrophage cultures.** Peritoneal exsudate cells were cultivated in presence of LPS. Data are reported as the mean  $\pm$  SD for at least five independent experiments carried out triplicate. ANOVA following Tukey test was used to compares the different groups. The significance of the differences between different groups production was: \*p $\leq$  0,001: compared to Group 1, #p $\leq$  0,01: compared to Group 2, +p $\leq$  0,001: compared to Group 2, &p $\leq$  0,001: compared to Group 5, §p $\leq$  0,001: compared to Group 6, §p $\leq$ 0,001: compared to Group 6, =p $\leq$ 0,001: compared to Group 4.

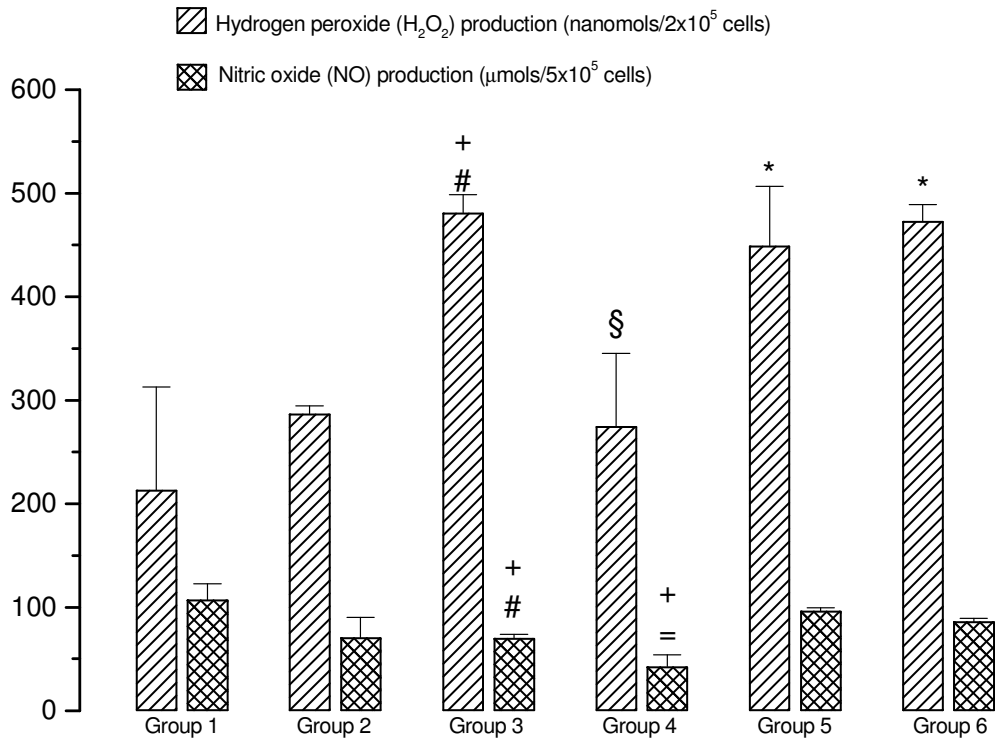
**Fig. 4: IFN- $\gamma$  production in peritoneal macrophage cultures.** Peritoneal exsudate cells were cultivated in presence of LPS. Data are reported as the mean  $\pm$  SD for at least five independent experiments carried out triplicate. ANOVA following Tukey test was used to compares the different groups. The significance of the differences between different groups production was: \*p $\leq$  0,01: compared to Group 2, #p $\leq$  0,001: compared to Group 2, +p $\leq$  0,001: compared to Group 5, §p $\leq$  0,001: compared to Group 6, §p $\leq$ 0,001: compared to Group 6, =p $\leq$ 0,001: compared to Group 4.

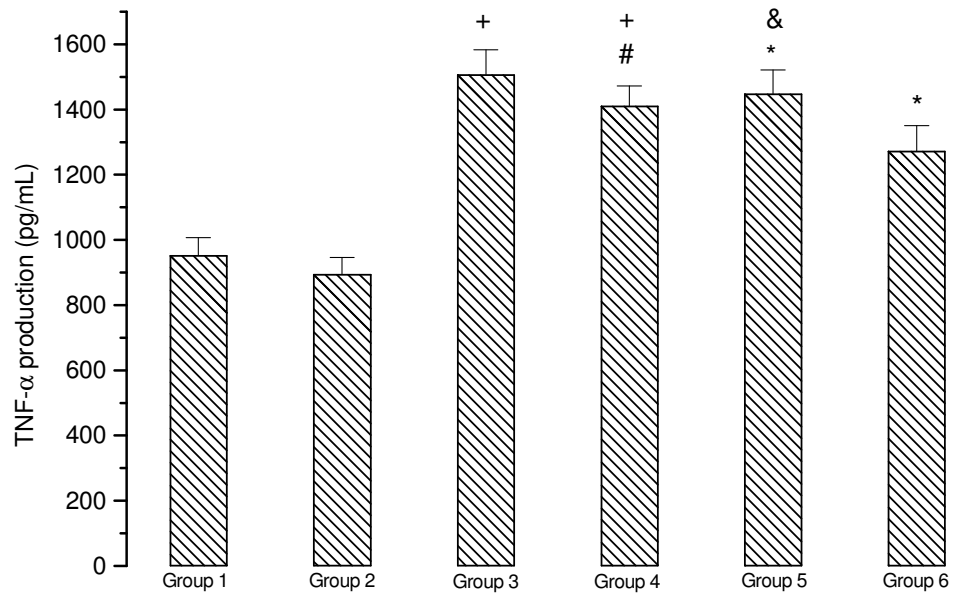
**Fig. 5: IL-4 production in peritoneal macrophage cultures.** Peritoneal exsudate cells were cultivated in presence of LPS. Data are reported as the mean  $\pm$  SD for at least five independent experiments carried out triplicate. ANOVA following Tukey test was used to compares the different groups. The significance of the differences between different groups production was: \*p $\leq$  0,01: compared to Group 2, #p $\leq$  0,05: compared to Group 2, +p $\leq$  0,01: compared to Group 5.

**Table 1:** Correlation analyses among different mediators in each group studied.

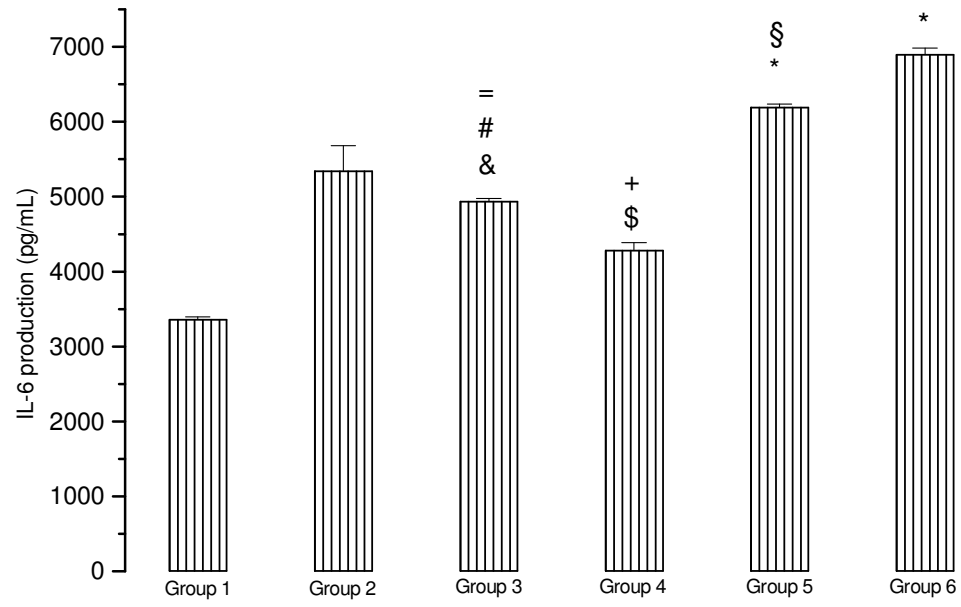
	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x NO	-	-	-	-	R=0,9144 <sup>*</sup>	R=0,6535 <sup>*</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IL-1 $\beta$	-	-	R=0,8420 <sup>*</sup>	-	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IL-6	-	R=0,6708 <sup>*</sup>	-	-	-	R=0,9858 <sup>&amp;</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x TNF	-	R=0,7293 <sup>*</sup>	-	-	-	R=0,9858 <sup>&amp;</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IFN- $\gamma$	-	-	R=0,7597 <sup>*</sup>	-	R=0,9790 <sup>&amp;</sup>	R=0,9858 <sup>&amp;</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> x IL-4	-	-	R=0,8453 <sup>*</sup>	-	-	-
NO x IL-1 $\beta$	-	-	-	R=0,9541 <sup>*</sup>	-	-
NO x IL-6	-	-	R=0,7978 <sup>*</sup>	-	-	R=0,6682 <sup>*</sup>
NO x TNF	-	-	-	R=0,6877 <sup>*</sup>	-	R=0,6682 <sup>*</sup>
NO x IFN- $\gamma$	R= 0,8460 <sup>*</sup>	-	R=0,7880 <sup>*</sup>	-	R=0,9772 <sup>&amp;</sup>	R=0,6682 <sup>*</sup>
NO x IL-4	-	-	R=0,6960 <sup>*</sup>	-	-	-
IL-1 $\beta$ x IL-6	-	-	R=0,6980 <sup>*</sup>	-	R=0,9757 <sup>&amp;</sup>	-
IL-1 $\beta$ x TNF	-	-	-	-	R=0,9616 <sup>+</sup>	-
IL-1 $\beta$ x IFN- $\gamma$	R=0,8460 <sup>*</sup>	-	R=0,8175 <sup>*</sup>	-	-	-
IL-1 $\beta$ x IL-4	-	-	-	-	R=0,8880 <sup>+</sup>	-
IL-6 x TNF	-	-	-	R=0,7403 <sup>*</sup>	R=0,9873 <sup>&amp;</sup>	R=1,000 <sup>&amp;</sup>
IL-6 x IFN- $\gamma$	-	R=0,9786 <sup>&amp;</sup>	R=0,9710 <sup>+</sup>	-	-	R=1,000 <sup>&amp;</sup>
IL-6 x IL-4	-	R=0,7174 <sup>*</sup>	-	-	R=0,9143 <sup>+</sup>	-
TNF x IFN- $\gamma$	-	-	-	-	-	R=1,000 <sup>&amp;</sup>
TNF x IL-4	-	R=0,8249 <sup>*</sup>	-	-	R=0,9665 <sup>+</sup>	-
IFN- $\gamma$ x IL-4	-	-	R=0,6837 <sup>*</sup>	-	-	-

\* p $\leq$  0,05, + p $\leq$  0,01, & p $\leq$  0,001.

**Figure 1**

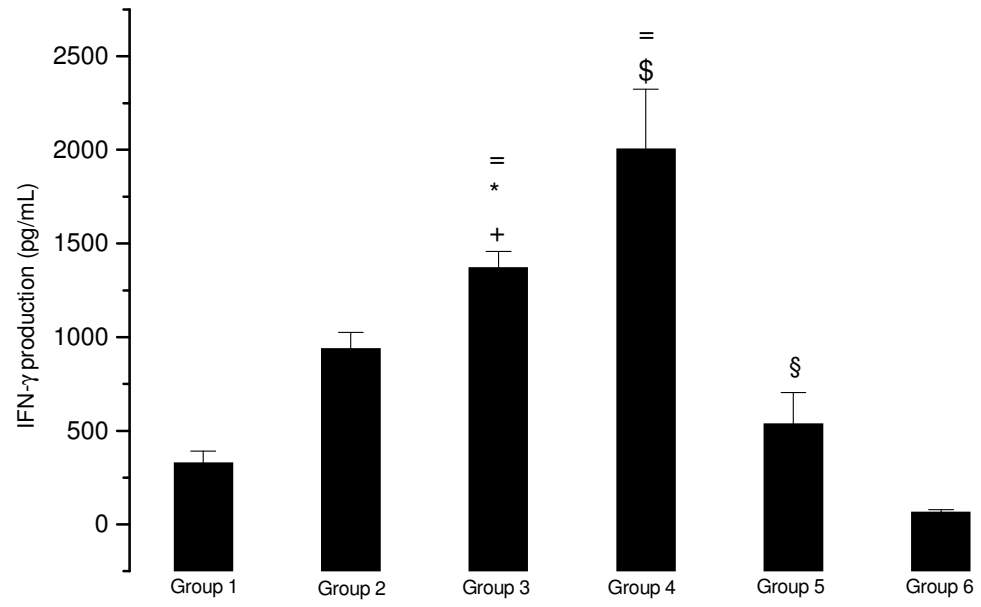


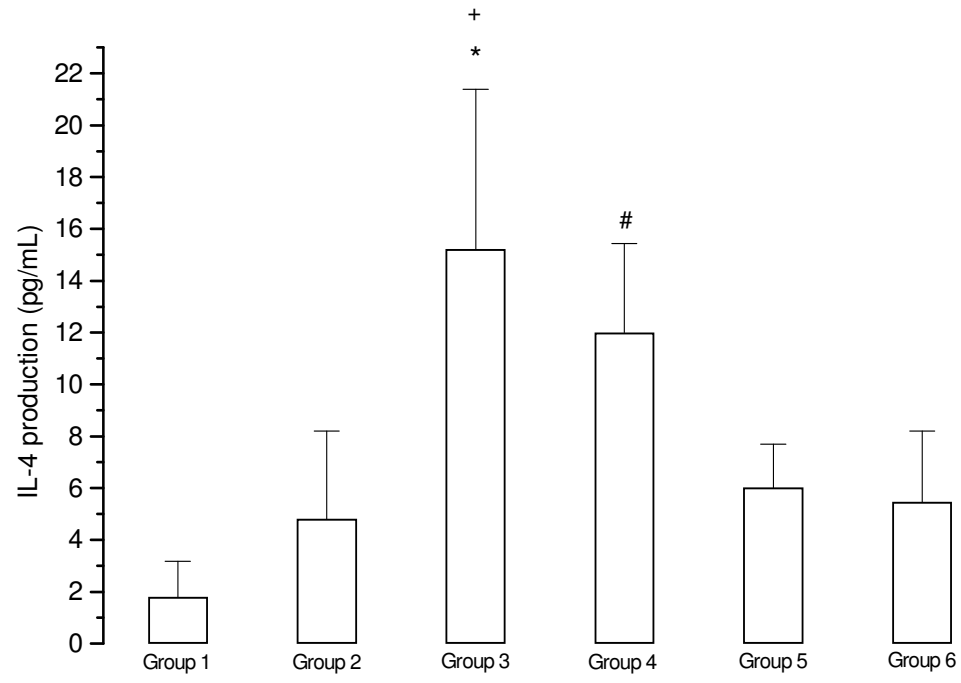
**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**