

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Victoria Elizabeth Galvão

**Atividade imunomoduladora de parasporina de *Bacillus*
thuringiensis sobre linfócitos e monócitos humanos**

Botucatu

2012

Victoria Elizabeth Galvão

**Atividade imunomoduladora de parasporina de *Bacillus thuringiensis* sobre
linfócitos e monócitos**

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de Botucatu,
como parte das exigências para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Kaneno

BOTUCATU

2012

Galvão, Victoria Elizabeth.

Atividade imunomoduladora de parasporina de *Bacillus thuringiensis* sobre
linfócitos e monócitos humanos / Victoria Elizabeth Galvão. – Botucatu, 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto
de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012

Orientador: Ramon Kaneno

Capes: 21102007

“O que torna heróico? Ir ao mesmo
tempo além da suprema dor e da
suprema esperança.”

Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

Eu agradeço primeira e principalmente, às três pessoas que foram e continuam sendo a base mais sólida que eu poderia querer: meu pai, Antonio, minha mãe, Moema, e meu irmão Letácio. Vocês são o meu alicerce mais forte, meu refúgio e minha maior alegria; eu os amo do fundo do coração, sou e serei sempre grata por ter tido em vocês a razão mais importante pra seguir em frente. Agradeço também à Pik (Debora), por ter sido a melhor colega de quarto e amiga que eu já tive. Por todos os dias, fossem eles engraçados e leves, e noites, fossem elas de festa, conversa ou cantoria (“Vítnei” que não nos ouvisse!), momentos tensos, difíceis e quase insuportáveis, eu te agradeço, por ter estado sempre ao meu lado e ter me adotado como “irmã mais nova”, por ter sido minha família em Botucatu.

Agradeço ao meu orientador Prof. Ramon pela oportunidade do trabalho, pela paciência e boa vontade, além de ter me proporcionado trabalhar com um grupo que veio a se tornar tão querido.

Agradeço também, portanto, às integrantes do Laboratório de Imunologia de Tumores: Ju, Fabi (Betty), Cecília (Dupexe), Marcela, Carol, Caru e Grá, pela ajuda dentro e fora do laboratório, pela amizade dedicada a mim e por terem feito parte da minha relativamente curta passagem por esse laboratório, cada qual a sua maneira.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Imunologia Pbmicose Régis, Tati e Dani por terem sempre sido solícitos, fosse com materiais ou experiência, e apesar da rotina corrida e por vezes tensa, bem-humorados, e as colegas de sala e ano Muriel (Sarna) e Laís (Somália), com as quais pude compartilhar o fim da graduação, as aflições e os momentos divertidos e várias vezes, sem muito sentido, mas muita graça.

Agradeço aos colegas de departamento Ana (secretaria), Lula (materiais, animais, e tudo mais que pudéssemos pensar), Luiz Alquati e Aline pela simpatia e boa vontade em ajudar com a parte técnica desde as autoclaves até da lida com animais.

Agradeço à Dra Marise Suzuki por ter gentilmente disponibilizado as proteínas utilizadas no trabalho, assim como agradeço a todos os doadores que voluntariamente participaram do desenvolvimento do projeto, já que foram de fundamental importância

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	16
3. DELINEAMENTO	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Obtenção e ativação das PS (PS-PK e PS-Tp)	16
4.2. Ensaio de linfoproliferação	17
4.3. Determinação de IL-10 e IFN- γ do sobrenadante das culturas	17
4.4. Liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	18
4.5 Liberação de óxido nítrico (NO)	19
4.6 Determinação de Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α).....	19
4.7 Análise Estatística	20
5. RESULTADOS.....	20
5.1. Ensaio de linfoproliferação	20
5.2. Determinação de IL-10 e IFN- γ do sobrenadante das culturas de linfócitos	22
5.3 – Ensaio de liberação de H ₂ O ₂	28
5.4- Determinação de NO das culturas de monócitos	33
5.5 – Determinação de TNF- α dos sobrenadantes de culturas de monócitos.....	33
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma espécie bacteriana ambiental de ampla distribuição, produtora de um grupo de proteínas cristalizáveis (Cry), que apresentaram toxicidade para diversas espécies de insetos e nematódeos. Mais recentemente, foi descrita uma nova classe de proteínas Cry denominadas parasporinas (PS) que, após degradação enzimática *in vitro*, mostram atividade citotóxica contra células tumorais humanas e de animais. Já foram descritos seis tipos de PS, PS1-PS6, e seus efeitos citotóxicos estão sendo esclarecidos a cada estudo. Apesar da atividade direta sobre células tumorais ser um foco atual de pesquisa, uma possível atividade imunomoduladora *in vitro* das PS ainda foi pouco explorada, sendo alvo do presente estudo. Assim, o presente projeto foi formulado para testar a hipótese de que a PS da cepa TC 2.3.1R6 de *B. thuringiensis* hidrolisada por proteinase-K (PS-PK) ou tripsina (PS-Tp) pode atuar como imunoestimulante sobre linfócitos e monócitos humanos favorecendo seu papel antitumoral. A PS-PK não apresentou atividade tóxica ou de estímulo de proliferação sobre linfócitos; entretanto, inibiu a produção de IL-10 por estas células e a produção de IFN- γ quando tratadas com mitógeno. A PS-Tp se mostrou inerte em relação a linfócitos tratados por 72 horas e ligeiramente tóxico em 120 horas, inibiu a produção de IL-10 induzida por ConA bem como a produção espontânea de IL-10 e IFN- γ em 120 horas. PS-PK se apresentou inibitória da produção de peróxido de hidrogênio e TNF- α por monócitos, enquanto que PS-Tp se mostrou estimulante da produção de H₂O₂ e de TNF- α .

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an environmental bacteria that produces a group of crystallizable proteins (Cry) that are toxic for several insects and worms species. Recently, it was described a novel class of Cry proteins called parasporins (PS) that showed cytotoxic effects on animal and human tumor cells. Six types of PS have been described so far, PS1 to PS6, and their cytotoxic activity has been studied. However, the direct effect on tumor cells has been the current research focus, while the immunomodulatory role of the PS has not been studied yet. Therefore, this study aimed to verify whether PS of TC 2.3.1R6 *B. thuringiensis* strain has immunostimulatory activity on human lymphocytes and monocytes. We have evaluated the protein toxicity against human cells, the lymphoproliferative activity and the effects on peripheral blood monocytes. The PS-PK showed no toxic or stimulating activity on lymphocyte proliferation. However, it inhibited the spontaneous production of IL-10 as well as ConA-induced and the production of IFN- γ . PS-PK decreased the release of hydrogen peroxide and increased the production of TNF- α by monocytes. PS-PK performed inhibitory production of hydrogen peroxide and TNF- α by monocytes, whereas PS-Tp showed stimulation of the production of hydrogen and TNF- α .

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, mesófila e quimioheterotrófica de ampla distribuição ambiental. Em condições adversas do meio, cessa seu processo de mitose e inicia a fase de esporulação quando, concomitantemente, há a inclusão de proteínas *Cry* à estrutura do esporo. Proteínas *Cry* são assim denominadas por se apresentarem naturalmente em forma cristalizada [1] e, dependendo da organização tridimensional dos cristais, essas proteínas são intituladas C1 (apresentam forma bipiramidal grande e larga), C2 (bipiramidal grande e delgada), C3 (redonda e pequena) e C4 (retangular pequena).

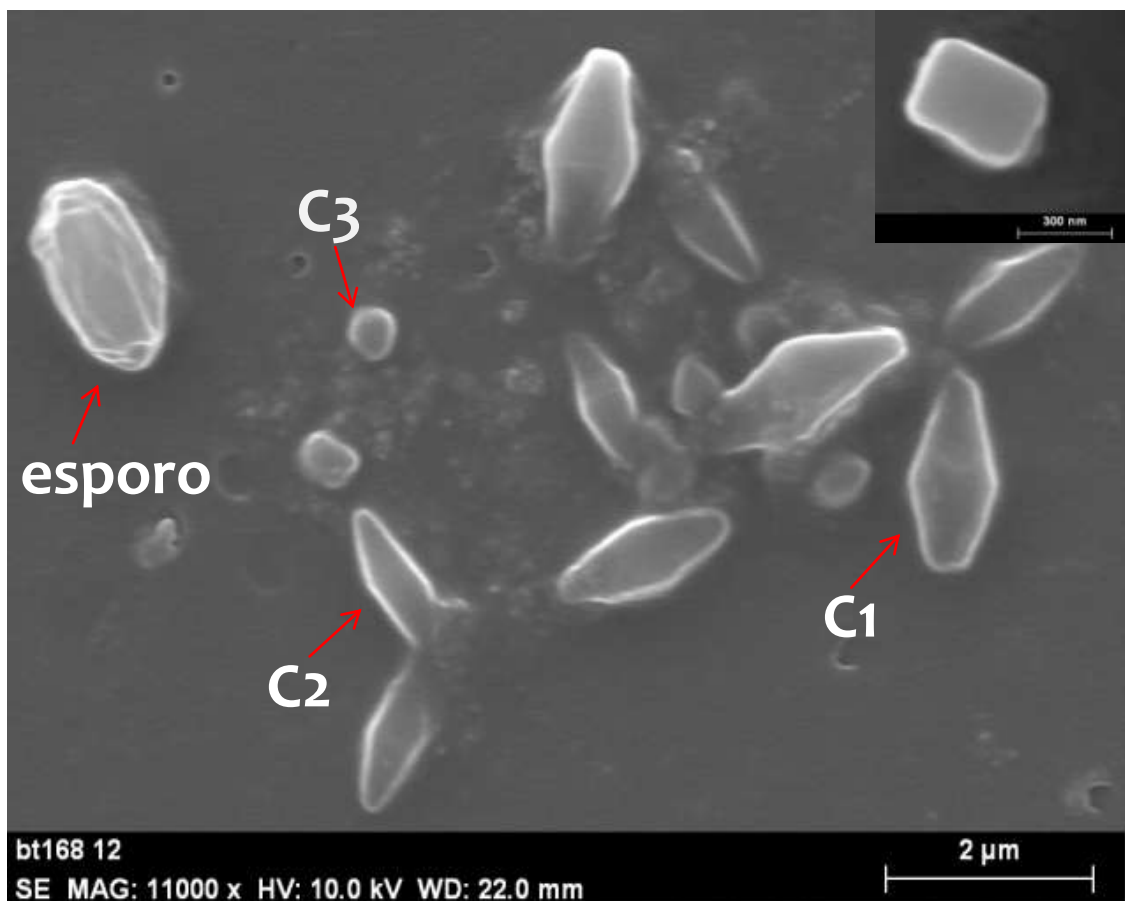


Foto de Microscopia Eletrônica de Varredura (11000x) mostrou 4 diferentes formas de cristais: C1-bipiramidal grande (tamanho similar a um esporo); C2- Bipiramidal médio; C3- pontual redondo ($< 0,5\mu\text{m}$); detalhe: pontual retangular ou cúbico ($< 0,5\mu\text{m}$). Foto do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ – USP Piracicaba

Devido à capacidade dessas proteínas de provocar a morte de insetos e nematódeos [2], foram inicialmente estudadas para uso no setor agrícola. Quando ingeridas por larvas de

artrópodes ou nematódeos sofrem digestão enzimática no intestino do animal, das porções C e N-terminais, tornando-se tóxicas. A toxicidade da proteína hidrolisada se dá pela ligação desta a receptores específicos de membrana das células epiteliais do trato intestinal do inseto, levando à formação de poros e consequente aumento de permeabilidade da membrana, desequilibrando a osmolaridade intracelular e levando o animal à morte [3]. Entretanto, estudos recentes indicam que as proteínas *Cry* com esse potencial inseticida estão presentes em menor incidência nas bactérias naturalmente encontradas, sendo que a maior parte destas proteínas não apresenta toxicidade contra insetos ou vermes [4].

De acordo com a denominação instituída por Mizuki *et al*, há um subgrupo de proteínas *Cry* denominadas parasporinas que não apresentam toxicidade a insetos, nematódeos e aracnídeos ou atividade hemolítica mas, *in vitro*, após hidrólise enzimática, apresentam propriedades citotóxicas preferencialmente frente a células tumorais humanas[1].

As PS mais bem estudadas foram PS1 (PS1Aa1), a qual possui estrutura polipeptídica de cerca de 723 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 80 kDa; apresenta também três domínios, sendo que após digestão enzimática da porção N-terminal da cadeia, passa a ter atividade antitumoral, e PS2 (PS2Aa1), com peso molecular de 37 kDa, que após proteólise das porções N e C-terminal, também adquire propriedades citotóxicas sobre células tumorais [1].

Outro estudo [5] teve seu foco sobre a ação das PS em diversas linhagens de células normais e tumorais, observando-se que as concentrações suficientes para lisar metade das células tumorais (DL_{50}) foram baixas, enquanto a atividade citotóxica da toxina sobre células normais exige concentrações cerca de 1000 vezes maiores do que para células tumorais. As linhagens de células T leucêmicas MOLT-4, Jurkat e HL60 se mostraram altamente suscetíveis à ação da PS, para as quais a DL_{50} foi de 0,044 μ g/mL, 0,015 μ g/mL e 0,066 μ g/mL respectivamente [5], assim como as de câncer hepático (HepG2) e câncer de cérvix uterino (Sawano) (0,023 μ g/mL e 0,041 μ g/mL) . As linhagens de células normais utilizadas tiveram pouca ou nenhuma suscetibilidade à toxina, com DL_{50} = 9,28 μ g/mL (UtSMC, células uterinas normais) ou superiores a 10 μ g/mL em células como em HC e TCS, de linhagens normais

hepáticas e de cérvix uterino. Nesse trabalho observou-se que linfócitos T normais também foram bastante suscetíveis à toxina, com DL_{50} de 0,0148 μ g/mL, próxima à das linhagens leucêmicas, enquanto que HeLa, A549 (célula tumoral pulmonar) e Caco-2 demonstraram grande resistência à toxina em altas doses.

Outro grupo [6] demonstrou a ausência de citotoxicidade contra linfócitos T normais em duas das três PS testadas, provenientes de diferentes cepas do Bt. Em ensaio utilizando peças cirúrgicas de câncer hepático, o tratamento com PS evidenciou citotoxicidade contra células malignas, com preservação do tecido saudável adjacente. Essa ação preferencial sobre células tumorais foi enfatizada por ser uma atividade interessante de preservação do tecido, uma vez que este já sofre a agressão pelo desenvolvimento da neoplasia. Lee *et al* [7] estudando a ação de uma proteína de 28 kDa de Bt da cepa 89-T-34-22 sobre células T leucêmicas e linfócitos T normais também chegou a conclusões semelhantes, com grande resistência das células normais à proteína ativada por proteinase-K, tendo portanto efeito análogo ao da PS.

O mecanismo pelo qual as proteínas agem ainda é objeto de pesquisa, mas foi observado que a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma proteína presente na membrana celular, serve de alvo para a PS de 68 kDa, em linfócitos T leucêmicos [8]. Os estudos de Katayama [9] apontam que o mecanismo intracelular de citotoxicidade da proteína PS1 consiste em aumentar o influxo de cálcio extracelular por processo independente de formação de poros na membrana com consequente ativação da cascata de caspases, resultando em morte celular por apoptose. Os resultados indicam ainda que a toxina não atinge o citoplasma, tendo sua ação desencadeada por interação com receptores de membrana específicos. Também demonstrou que o potencial de membrana não é alterado, assim como sua permeabilidade, sendo que o mecanismo pelo qual a PS leva a esse influxo ainda é incerto.

A proteína PS2 por sua vez, tem a capacidade de se ligar a rafts lipídicos [10] e proteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) [11] presentes na membrana de células tumorais hepáticas, de útero e T leucêmicas. Essa proteína sofre oligomerização alterando a permeabilidade da membrana e formando poros, pelos quais ocorre influxo de fluido

extracelular, rompimento do controle osmótico da célula e morte por necrose ou apoptose devido à falta de manutenção da concentração ótima de cálcio intracelular, levando a ativação da caspase-3. Assim como a PS1, esta também apresenta atividade preferencial por células tumorais em peças cirúrgicas de tumores hepáticos [3].

Okumura *et al* [12] estudaram os efeitos da PS4 produzida pela cepa A1470 de Bt sobre as linhagens de células tumorais Caco-2, HeLa, MOLT-4 e K562 (células eritroleucêmicas). À concentração final de 4µg/mL, as células Caco-2 e MOLT-4 apresentaram modificações morfológicas, enquanto que HeLa e K562 não tiveram tais mudanças. Com o objetivo de investigar a natureza do mecanismo de formação de poros na membrana celular a linhagem tumoral de cólon foi dividida em dois grupos, um submetido à depleção de colesterol e outro não, e estes foram tratados com estreptolisina O (grupo controle) e PS4. O tratamento com PS4 em concentração de 1 µg/mL e 10µg/mL provocou a morte de quase a totalidade das células nos dois grupos (depletado e não-depletado), enquanto que quando tratadas com estreptolisina O à concentrações de 0,01U/µL a 10U/µL, células depletadas mantiveram sua viabilidade inicial, e as não-depletadas de colesterol tiveram viabilidade final também próxima a 0%. Concluiu-se então que a PS4 é uma proteína formadora de poro (PTF) independente de colesterol, diferentemente da estreptolisina, mas o receptor de membrana a que a PS4 se liga ainda não é conhecido.

Ensaio preliminares do nosso grupo permitiram observar que células de tumor colorretal da linhagem HCT-116 têm suscetibilidade à proteína hidrolisada por tripsina ou proteinase-K, como pode ser observado nas Figuras 1 e 2:

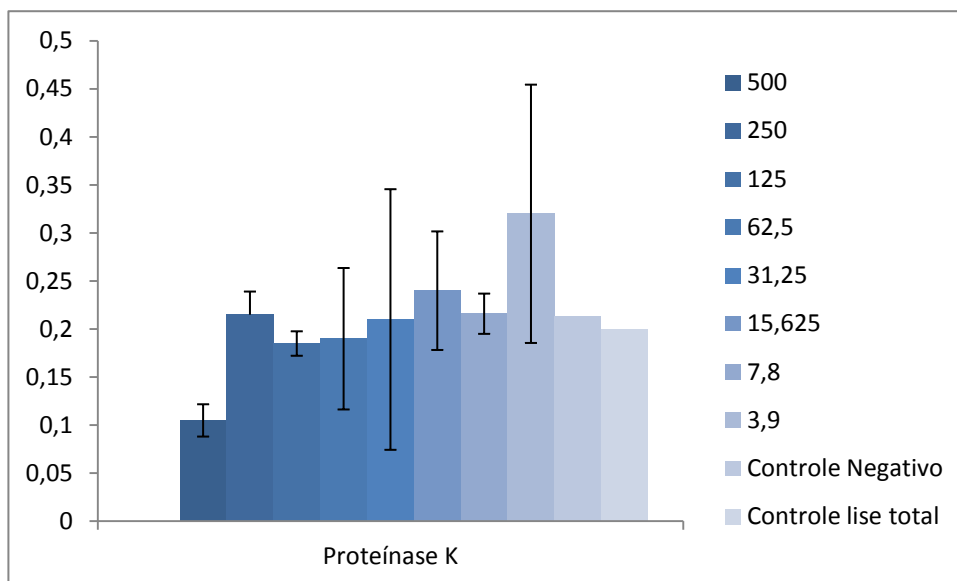


Figura 1 Ensaio de citotoxicidade de PS-PK sobre HCT-116 - Células tumorais foram cultivadas por 24 horas e então tratadas com PS-PK. O gráfico indica a média $\pm$ SD da viabilidade (em D.O.da) após tratamento com diferentes concentrações da proteína.

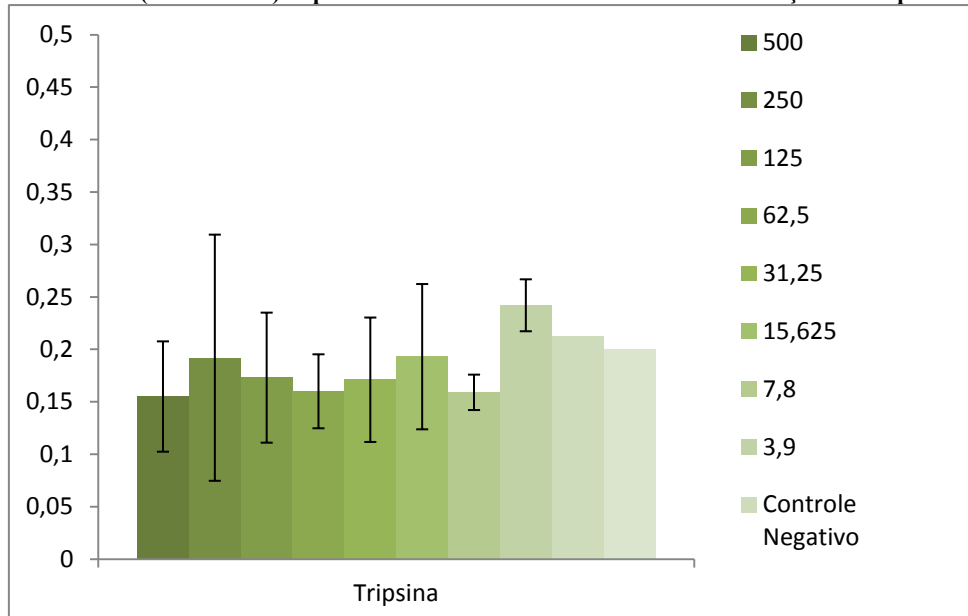


Figura 2 Ensaio de citotoxicidade de PS-Tp sobre HCT-116 - Células tumorais foram cultivadas por 24 horas e então tratadas com PS-Tp. O gráfico indica a média $\pm$ SD da viabilidade (em D.O.) após tratamento com diferentes concentrações da proteína.

O desenvolvimento de tumores depende de uma ampla variedade de fatores que envolvem características de crescimento e adaptação das células tumorais e também a forma como o hospedeiro reage à presença ou ocorrência de células transformadas. Assim, a intensidade e a qualidade da resposta imune que se desenvolve contra o tumor pode ser um fator determinante para o hospedeiro.

Desse modo, a busca por produtos naturais ou artificialmente sintetizados capazes de modular o sistema imune para que ocorra uma resposta antitumoral efetiva é tão essencial quanto a pesquisa de produtos com ação direta sobre o tumor. De fato, muitos compostos provenientes de fontes naturais como plantas medicinais, fungos e as próprias bactérias são conhecidos e estudados por sua capacidade de estimulação do sistema imune [13].

A resposta imunológica contra tumores se baseia em mecanismos celulares, envolvendo processos de sinalização e ativação linfocitária através de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12 e IL-18. A ocorrência dessas citocinas aumenta a atividade de células apresentadoras de antígenos (APC) favorecendo a geração de linfócitos T específicos para antígenos tumorais. Entre as citocinas com propriedades antitumorais, o interferon gama (IFN- γ) é capaz de promover a proliferação da subpopulação de linfócitos Th1 e de intensificar a atividade citotóxica das células T citotóxicas. O IFN- γ também resulta da ativação de linfócitos Th1, e é capaz de ativar componentes da imunidade inata tais como células NK e macrófagos. Desse modo, produtos capazes de induzir a produção de citocinas promotoras da resposta Th1 podem apresentar grande potencial para complementar as terapias antitumorais convencionais.

Por outro lado, o tumor pode levar à atividade de células Th2 e TReg, que exercem ação regulatória sobre a resposta antitumoral pela produção de citocinas como a interleucina 10 (IL-10). Portanto, um tratamento que leve a uma alta relação IFN- γ /IL-10 indicaria uma maior atividade de células Th1 efectoras e menor atividade de células Th2 ou Treg. Uma vez ativados, os monócitos podem exercer ação tumoricida direta ou favorecer o combate ao tumor através da produção de IL-12, que estimula a geração de Th1. Assim sendo, diferentemente da abordagem dos estudos que têm enfatizado a ação direta da PS sobre células tumorais, nosso interesse é confirmar a ausência de citotoxicidade sobre células do sistema imune e verificar se a toxina possui atividade imunomoduladora, o que aumentaria seu potencial de uso na terapia antitumoral.

2. OBJETIVO

O objetivo geral do projeto foi avaliar o potencial imunoestimulador das PS de *B. thuringiensis*. Especificamente, avaliamos sua ação sobre:

- a) a capacidade proliferativa de linfócitos humanos de sangue periférico avaliando sua atividade mitogênica (ensaio de 72 horas) e antigênica (ensaio de 120 horas);
- b) a produção *in vitro* de IFN- γ e IL-10 por esses linfócitos;
- c) a produção de H₂O₂, NO e TNF- α por monócitos humanos de sangue periférico;

3. DELINEAMENTO

Linfócitos de doadores voluntários normais saudáveis foram isolados, plaqueados e tratados com PS-PK ou PS-Tp em 6 concentrações para avaliar a toxicidade e a capacidade de indução de linfoproliferação. O sobrenadante das culturas foi coletado após 72 e 120 horas para quantificação do IFN- γ e IL-10. Células mononucleares de doadores voluntários normais saudáveis foram coletadas e as células aderentes do sangue periférico foram mantidas em cultura por 24 horas com PS com subsequente avaliação de produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e TNF- α

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e ativação das PS (PS-PK e PS-Tp)

Os cristais sintetizados pela bactéria Bt TC2.3.1R6 que foram utilizados provavelmente eram Cry8Ba, Cry19Ba, Cry24Aa e Cry41Aa1. Para a obtenção de PS, primeiramente o Bt foi cultivado em meio CCY, responsável pela indução de esporulação da bactéria, sob agitação de 200rpm a 28°C até que houvesse completa esporulação e formação dos cristais protéicos. Os cristais foram solubilizados em tampão carbonato 50 mM pH 10,5 e DTT ([Dithiothreitol](#)) 10 mM. Após a solubilização dos cristais, foi determinada a concentração protéica pelo método de Bradford, usando albumina bovina (BSA). A etapa seguinte foi de ativação da proteína por tripsina e proteinase-K, em proporções de 1:50 e 1:30 (proteína e enzima), respectivamente. A

amostra de proteína solubilizada em tripsina foi submetida à baixa agitação durante 2 horas, à temperatura de 30°C, centrifugada e o sobrenadante recuperado para quantificação da PS-Tp. A PS-PK foi submetida à baixa agitação durante 1 hora, à temperatura de 30°C, centrifugada, seguido de quantificação da proteína ativa.

4.2. Ensaio de linfoproliferação

Células mononucleares humanas foram obtidas através de sangue periférico de doadores voluntários saudáveis (20 mL, n=8), após esclarecimento do projeto e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 1) aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu. As células foram lavadas, ajustadas a 2.10^6 cél/mL, cultivadas em placa de 96 alvéolos de fundo plano e tratadas com 6 concentrações de PS-PK ou PS-Tp por 3 dias (72 horas) e 5 dias (120 horas). As culturas de 72 horas foram repetidas na presença de Concanavalina A (ConA), um mitógeno para linfócitos T, à concentração de 5 µg/mL, com a intenção de avaliar o efeito da PS sobre a linfoproliferação induzida. As culturas de 72 horas e 120 horas foram centrifugadas após os respectivos tempos de tratamento, o sobrenadante coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem de citocinas. As culturas foram então incubadas com solução de MTT a 1 mg/mL por mais 4 horas. O sobrenadante foi retirado e os cristais de formazana foram solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida em leitor de ELISA a 540 nm para avaliar citotoxicidade e/ou proliferação celular.

4.3. Determinação de IL-10 e IFN- γ do sobrenadante das culturas

Os sobrenadantes coletados dos ensaios de linfoproliferação de 72 horas com e sem estímulo (ConA) e de 120 horas foram descongelados e utilizados para quantificação de IL-10 e IFN- γ . A dosagem foi feita através do ensaio enzimático de ELISA, utilizando kits comerciais BioLegend.

Placas de 96 alvéolos de fundo plano foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpos de captura específicos para cada citocina por incubação a 4°C overnight. No dia seguinte, a placa

foi lavada 4 vezes com PBS e detergente Tween®20 a 0,05% e incubada com reagente diluente para bloquear reações inespecíficas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi lavada novamente 4 vezes com PBS Tween® e incubada com os sobrenadantes das culturas de linfócitos e a curva padrão por mais 2 horas a temperatura ambiente.

Após a incubação com as amostras a placa foi lavada 4 vezes com PBS Tween® e foram adicionados 100µL de suspensão de anticorpos de detecção. Após outra hora de incubação, a placa foi novamente lavada e incubada com 100µL de avidina por mais 30 minutos. Foi lavada mais 5 vezes com PBS Tween, desta vez deixando-o por 30 segundos a 1 minuto na placa antes de retirá-lo. Foi então adicionado TMB e a placa foi incubada por alguns minutos até que a curva atingisse cor visível e distinguível. A reação foi bloqueada pela adição de solução ácida (2N H₂SO₄). A leitura foi realizada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450nm

4.4. Liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para determinação de H₂O₂ por monócitos, células mononucleares de sangue periférico foram cultivadas em placas de 96 alvéolos de fundo plano à concentração de 2x10⁶ células/mL e incubadas em estufa por duas horas a 37°C a tensão de 5% de CO₂. Células aderentes continuaram em cultura e foram tratadas com PS-PK ou PS-Tp. As culturas foram repetidas na presença de LPS, um indutor de ativação de macrófagos, para verificar ação sinérgica ou antagônica da PS; LPS e PMA, um ativador de proteína cinase C, responsável pela indução de liberação de peróxido de hidrogênio pela célula, e apenas PMA. Após 24 horas, os sobrenadantes foram removidos e 100µL de solução de fenol vermelho 1% contendo 140mM NaCl, 10mM K₂HPO₄, 5,5 mM de dextrose e 5mM de peroxidase (HRP) foram adicionados às culturas e estas foram incubadas por mais 1 hora a 37°C e tensão de CO₂ de 5%. A reação foi cessada pela adição de 10µL de 1N NaOH e a absorbância foi medida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 620nm [14].

4.5 Liberação de óxido nítrico (NO)

A produção de NO por monócitos foi determinada pela reação de Griess [15]. Os sobrenadantes de culturas (obtidos como especificado no item 4.4) foram coletados após 24 horas e a eles foram adicionados 100µL de reagente de Griess (N-1-naphtil-etil-enediamina 0,1% + sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5%). Após 10 minutos a absorbância foi medida em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm.

4.6 Determinação de Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α)

Os sobrenadantes coletados das culturas de monócitos de 24 horas tratadas com PS-PK ou PS-Tp com ou sem estímulo de LPS foram descongelados e utilizados para quantificação de TNF- α . A dosagem foi feita através do ensaio enzimático de ELISA, utilizando kits comerciais BD Bioscience®.

Placas de 96 alvéolos de fundo plano foram sensibilizadas com 100µL de anticorpos de captura específicos por incubação a 4°C overnight. No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e detergente Tween®20 a 0,05% e incubada com reagente diluente para bloquear reações inespecíficas por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente a placa foi lavada novamente 3 vezes com PBS Tween® e incubada com os sobrenadantes das culturas de monócitos e a curva padrão por mais 2 horas a temperatura ambiente.

Após a incubação com as amostras a placa foi lavada 5 vezes com PBS Tween® e foram adicionados 100µL de suspensão de anticorpos de detecção + streptavidina . Após outra hora de incubação, a placa foi lavada com PBS Tween® 7 vezes, desta vez deixando-o por 30 segundos a 1 minuto na placa antes de retirá-lo. Foram então adicionados 100 µL de solução de substrato TMB, e a placa foi incubada por alguns minutos até que a curva atingisse cor visível e distinguível. A reação foi bloqueada pela adição de solução ácida (2N H₂SO₄). A leitura foi realizada em leitor de ELISA em comprimento de onda de 450nm.

4.7 Análise Estatística

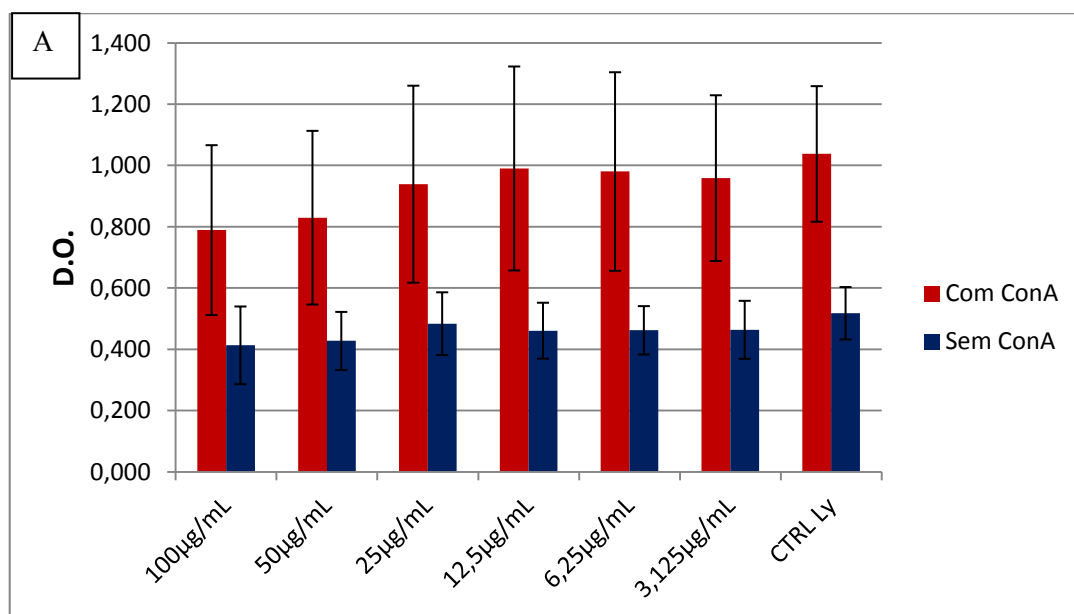
Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas, sendo consideradas significantes as diferenças cujas probabilidades de erro foram menores que 5% ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio de linfoproliferação

A análise dos dados permite observar que, comparando-se resultados das culturas de 72 horas de linfócitos tratados com seis concentrações de PS-PK ou PS-Tp (100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,25 µg/mL; 3,125 µg/mL) ao grupo controle, não há diferença estatística significativa; os resultados das culturas com PS-PK ou PS-Tp e mitógeno (ConA) em relação aos respectivos controles também não mostraram diferenças significativas estatisticamente.

Assim, PS-PK e PS-Tp não apresentam, nas concentrações utilizadas, atividade linfoproliferativa nem citotóxica direta. Quando utilizadas em associação à ConA, não interferem em sua ação mitogênica, não inibindo-a ou potencializando-a. Portanto, não demonstram ter ação importante sobre os sítios de atuação da ConA.



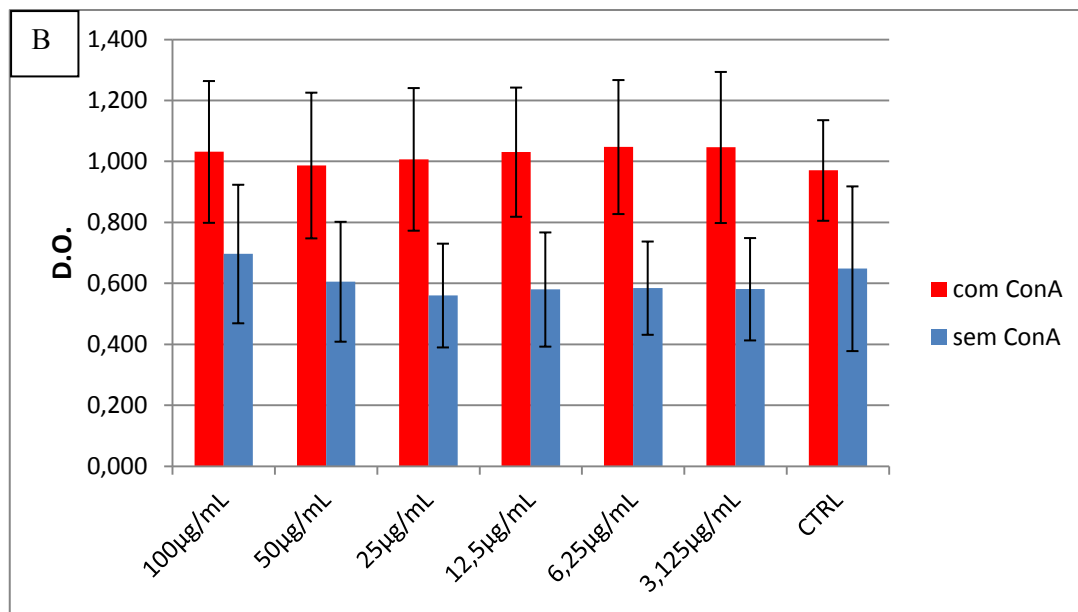


Figura 3 – Atividade proliferativa de linfócitos tratados com PS-PK ou PS-PK+ConA (A) e linfócitos tratados com PS-Tp ou PS-Tp + ConA (B). A viabilidade celular foi avaliada por metabolização do MTT e dissolução dos cristais de formazana. Média $\pm$ SD de 8 avaliações independentes. Dados expressos em D.O.

Com o objetivo de avaliar se as proteínas PS-PK têm a capacidade de induzir resposta imune específica, linfócitos foram cultivados por 120 horas sem a presença de mitógeno. As diferenças não foram consideradas significantes, indicando que a proteína não possui efeito linfoproliferativo sobre as células, mesmo com um tempo maior de interação entre elas

Diferentemente do que se observou com a PS-PK, a PS-Tp foi tóxica às concentrações utilizadas, quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Entretanto, a concentração de 100 µg/mL se mostrou a menos tóxica em relação às outras cinco ($p < 0,05$).

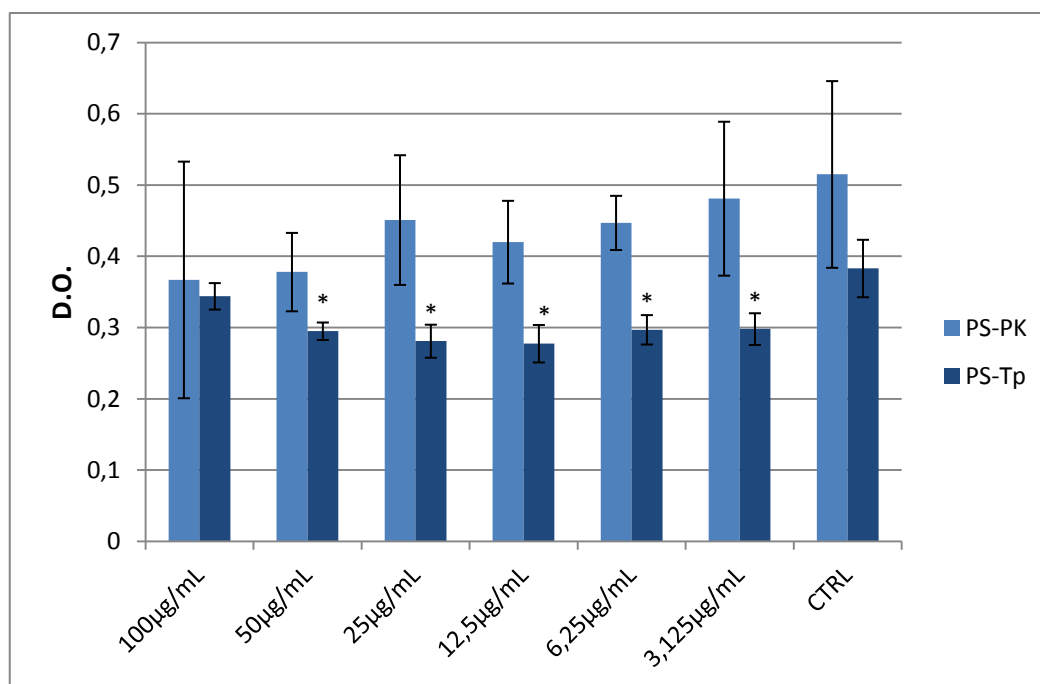


Figura 4 Atividade proliferativa de linfócitos tratados por 120 horas com PS-PK ou PS-Tp. A viabilidade celular foi avaliada por metabolização do MTT e dissolução dos cristais de formazana. Média $\pm$ SD de 8 avaliações independentes. Dados expressos em D.O. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle do ensaio.

5.2. Determinação de IL-10 e IFN- γ do sobrenadante das culturas de linfócitos

A análise dos resultados da quantificação de IL-10 no sobrenadante das culturas de 72 horas com PS-PK mostrou que a concentração mais elevada da proteína (100µg/mL) reduziu significativamente a produção desta citocina ($p < 0,01$) pelos linfócitos. Não houve diferença significativa entre os resultados das demais concentrações utilizadas em relação ao controle. O mesmo ocorreu no caso das culturas com ConA, porém, com valores totais mais elevados, indicando que o aumento se deve ao aumento do número de células proporcionado pelo tratamento com mitógeno e que a PS-PK não interfere na ação mitogênica da ConA.

O tratamento com PS-Tp por 72 horas não foi inibitório em relação à produção espontânea de IL-10 por linfócitos, não mostrando diferença significativa de concentração de citocina entre os tratamentos. Quando PS-Tp foi aliada à exposição à ConA no entanto, as concentrações de 100µg/mL, 50µg/mL e 25µg/mL se mostraram inibitórias em relação ao controle.

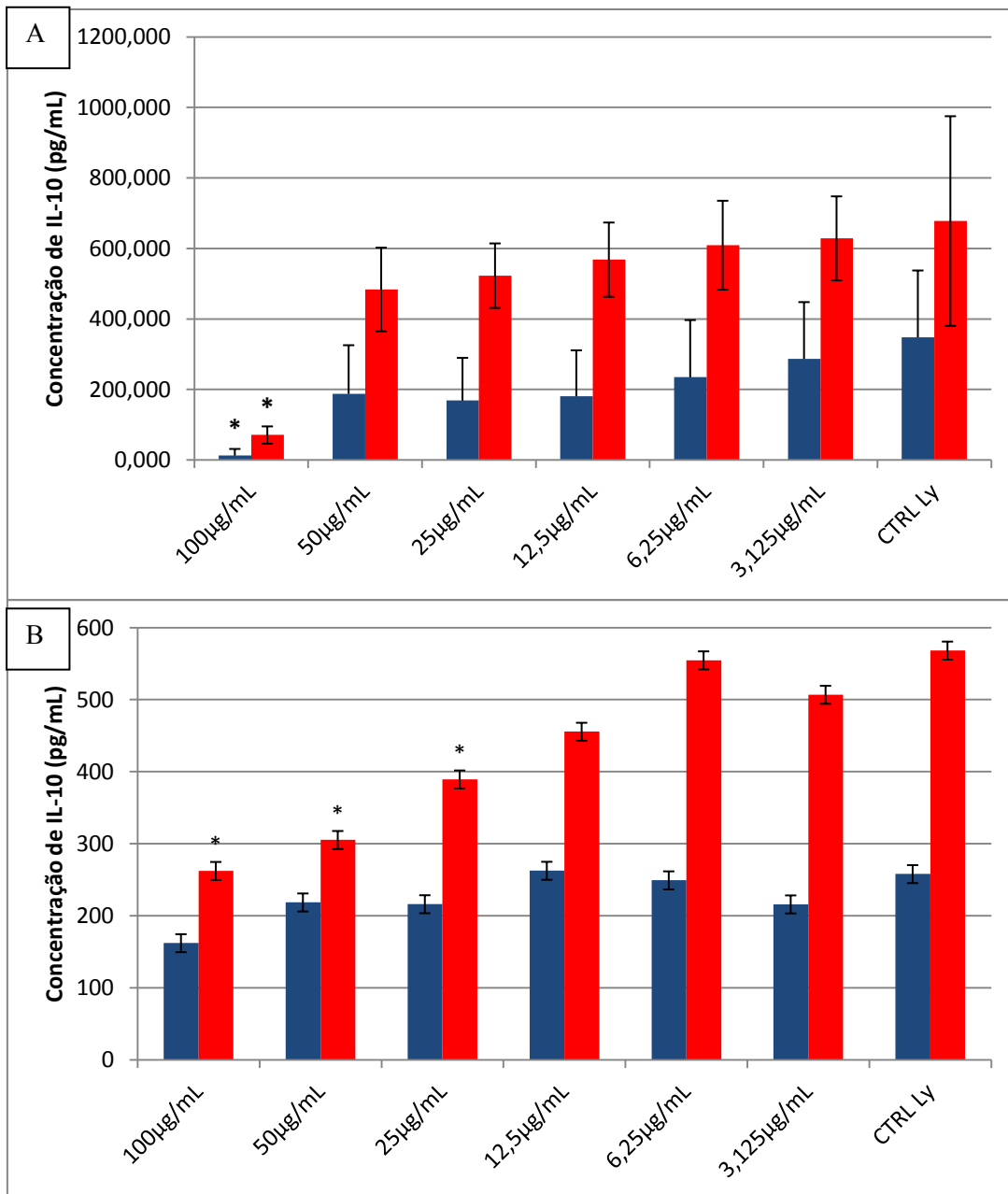


Figura 5- Determinação de IL-10 em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 72 horas com PS-PK ou PS-PK+ConA (A) e PS-Tp ou PS-Tp+ConA (B). Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle.

Também foi realizado ensaio de ELISA com os sobrenadantes das culturas de 120 horas de tratamento apenas com a proteína. Pode-se observar que há diminuição gradativa da produção da citocina à medida que a concentração de proteína aumenta, chegando à maior concentração com produção ínfima ou nula. De modo semelhante ao que ocorreu com a PS-PK, o tratamento de linfócitos com PS-Tp por tempo prolongado (120 horas) induziu redução da produção de IL-10, de modo dose-resposta ($p < 0,05$).

Este resultado indica que a exposição de células à parasporina por tempo prolongado inibe a síntese de IL-10 de modo dose-resposta.

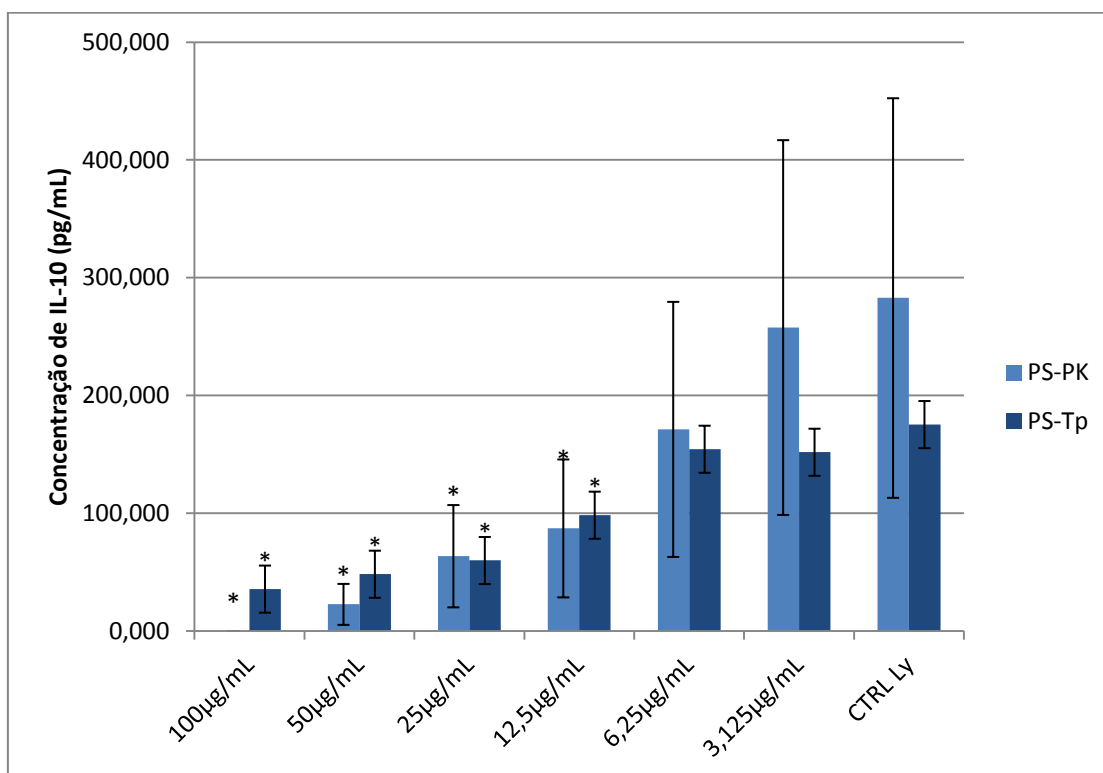


Figura 6- Determinação de IL-10 em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 120 horas com PS-PK. Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras independentes. (*) $p \leq 0,05$ em comparação ao controle.

Na Figura 7 observa-se que a adição de PS-PK não induz diferença significativa na produção de IFN- γ comparando-se os resultados das seis concentrações de PS-PK ao controle, exceto à concentração de 100µg/mL.

A análise das culturas de linfócitos cultivadas em presença da ConA mostra resultados bem homogêneos, com valores muito acima dos encontrados nas culturas sem mitógeno, exceto com 100µg/mL de PS-PK que reduziu significativamente a produção de IFN- γ por linfócitos.

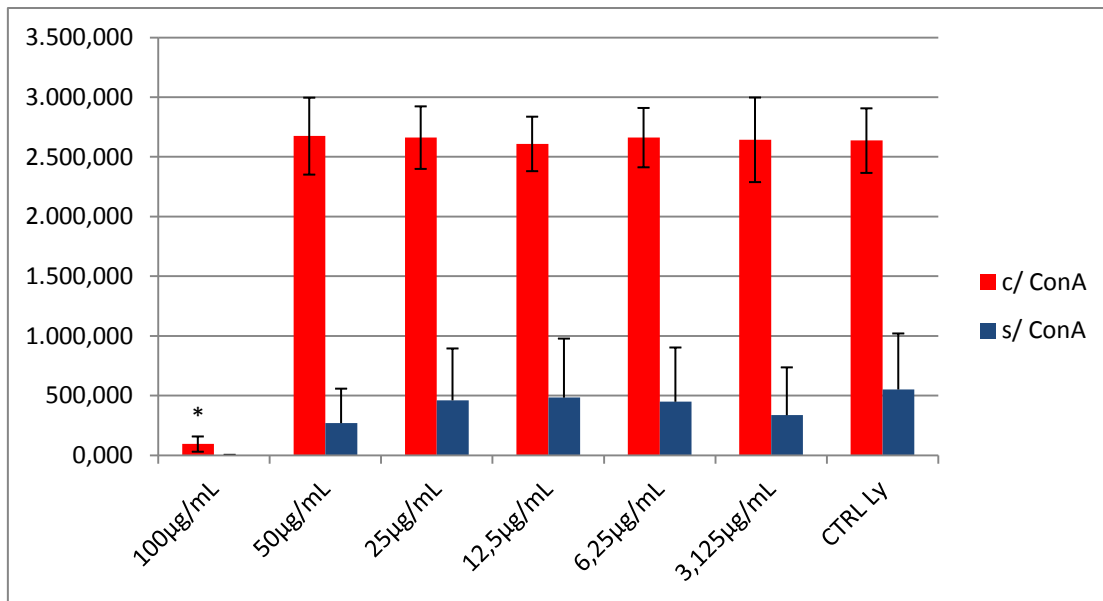


Figura 7 - Determinação de IFN- γ em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 72 horas com PS-PK. Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras.

A exposição dos linfócitos pelo período de 120 horas inibiu a produção de IFN- γ quando as concentrações utilizadas foram 100µg/mL e 50µg/mL. A concentração de 50µg/mL também reduziu a produção desta citocina, porém a diferença em relação ao controle não foi significativa.

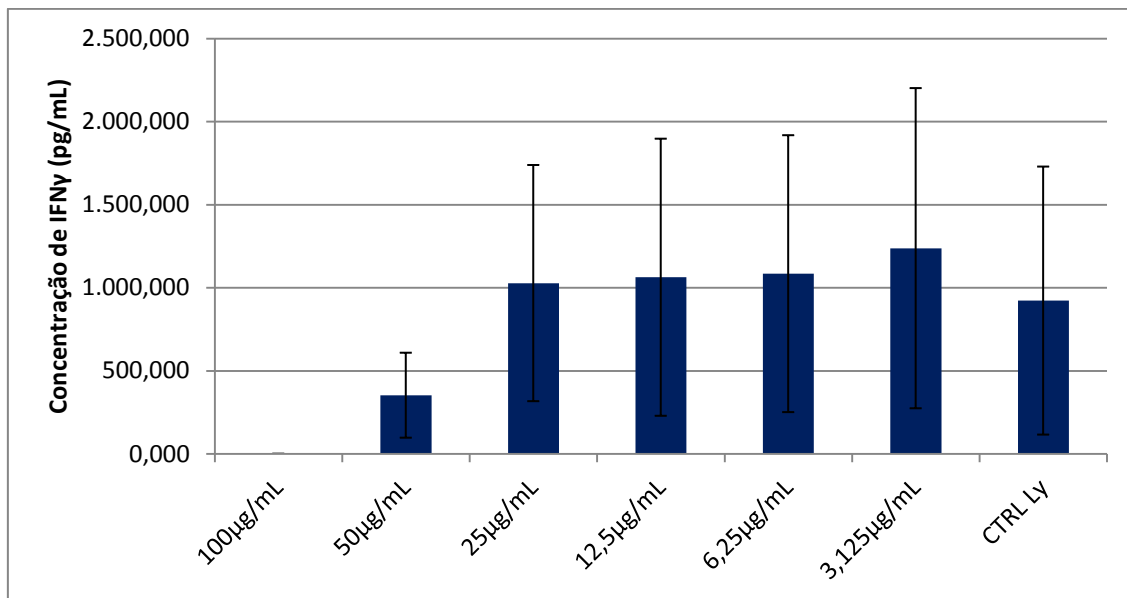


Figura 8 - Determinação de IFN- γ em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 120 horas com PS-PK. Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras.

A análise dos resultados da quantificação de IFN- γ no sobrenadante das culturas de 72 horas com PS-Tp mostrou que não houve diferença estatística significativa na produção da citocina por linfócitos tratados com as seis concentrações de PS.

Nos sobrenadantes de culturas de 120 horas tratadas com a proteína nessas condições a produção total de citocina é maior e há um perfil de produção de IFN- γ que sugere ser um efeito dose-resposta. As concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e de 50 $\mu\text{g/mL}$ de PS foram inibitórias da produção de IFN- γ em relação ao controle ($p<0,05$).

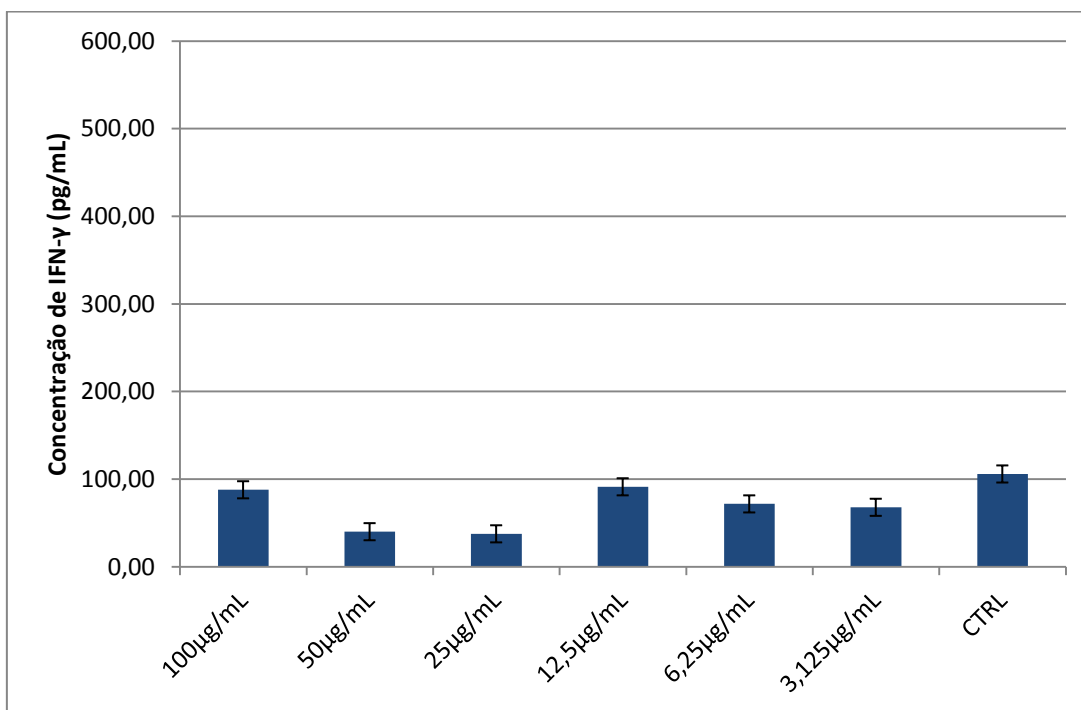


Figura 9 -Determinação de IFN- γ em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 72 horas com PS-Tp. Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras.

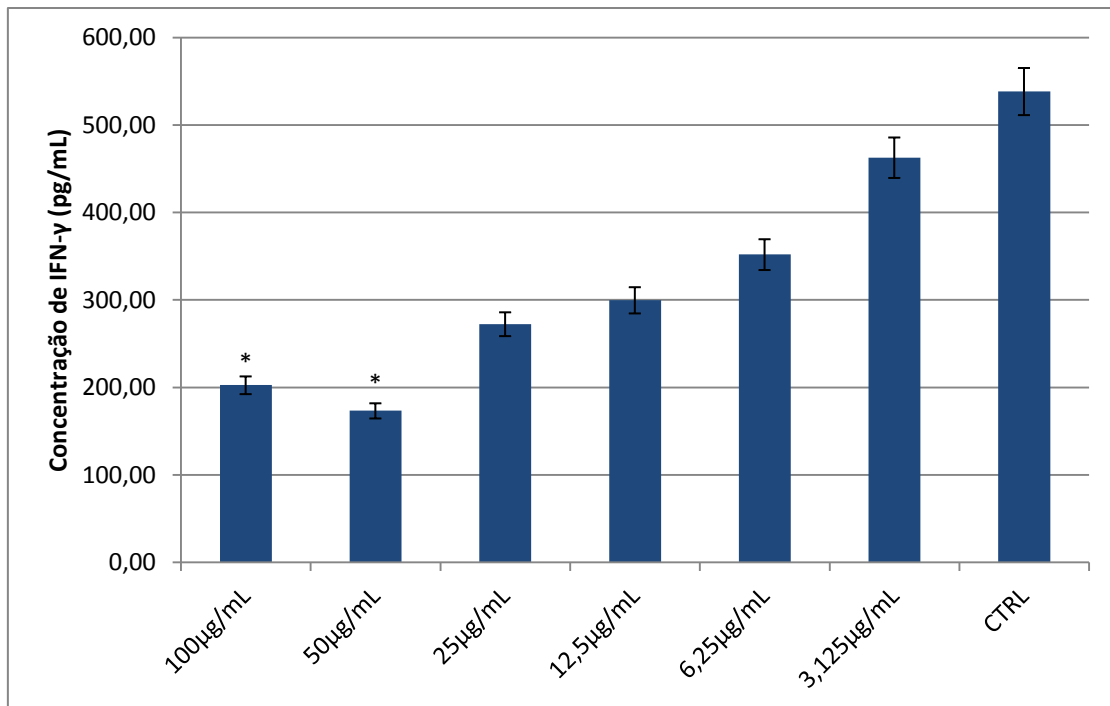


Figura 10 -Determinação de IFN- γ em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 120 horas com PS-Tp. Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras. (*) $p < 0,05$ em relação ao controle.

Quando avaliados os sobrenadantes das culturas de 72 horas repetidas em presença de ConA, não houve diferença significativa entre a produção de IFN- γ em grupos tratados e o controle; ainda que a concentração de PS-Tp de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ tenha levado à menor produção de citocina do experimento, esta diferença não foi suficiente para afirmar que nessas condições a proteína teve atividade inibitória sobre a secreção de IFN- γ por linfócitos.

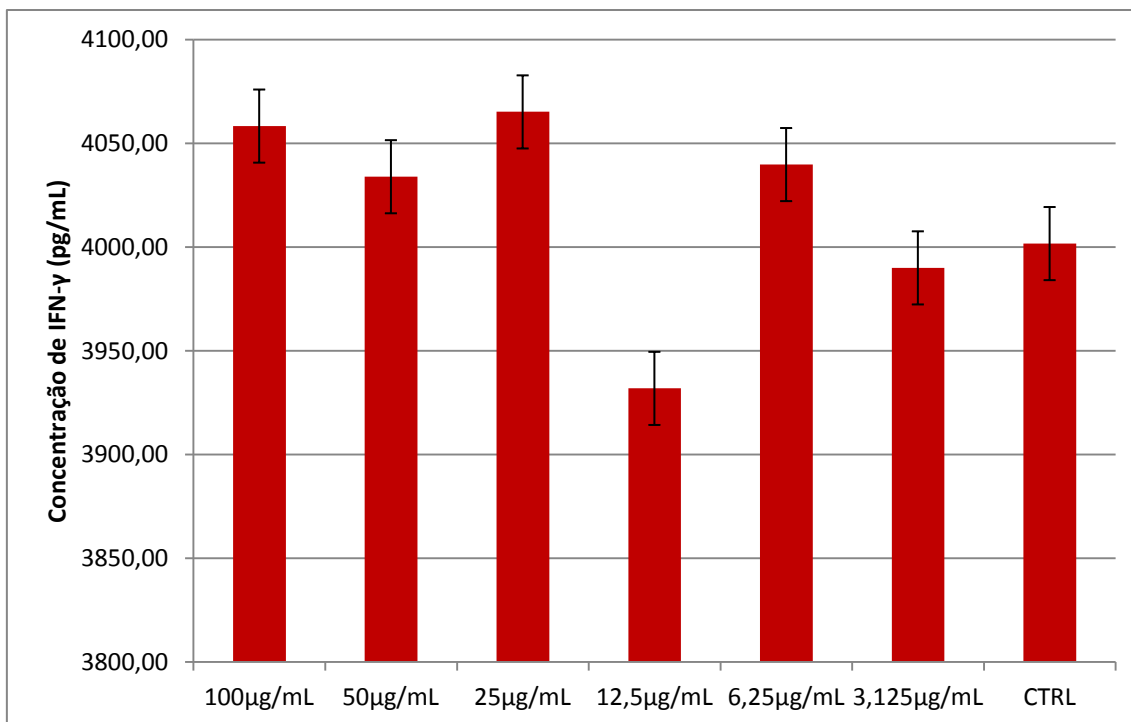


Figura 11- Determinação de IFN- γ em sobrenadante de culturas de linfócitos, incubados por 72 horas com PS-Tp e ConA. Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras.

5.3 – Ensaio de liberação de H_2O_2

Para a realização dos ensaios de liberação de peróxido de hidrogênio por macrófagos, as concentrações de PS-PK foram alteradas para 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,25 $\mu\text{g/mL}$, pois as concentrações anteriormente utilizadas tornaram o ensaio pouco sensível. Assim sendo, as culturas de macrófago estiveram em contato com a proteína por 24 horas antes da realização do ensaio para identificação de peróxido de hidrogênio. As culturas foram repetidas em presença de LPS, LPS + PMA e apenas de PMA.

Os resultados utilizando apenas a PS-PK e PS-PK associada ao LPS foram inconclusivos, uma vez que a produção de peróxido de hidrogênio foi ínfima na maior parte das concentrações de PS-PK, impossibilitando uma análise estatística condizente, indicando que a PS por si só, não é capaz de induzir a produção de níveis consideráveis de H_2O_2 .

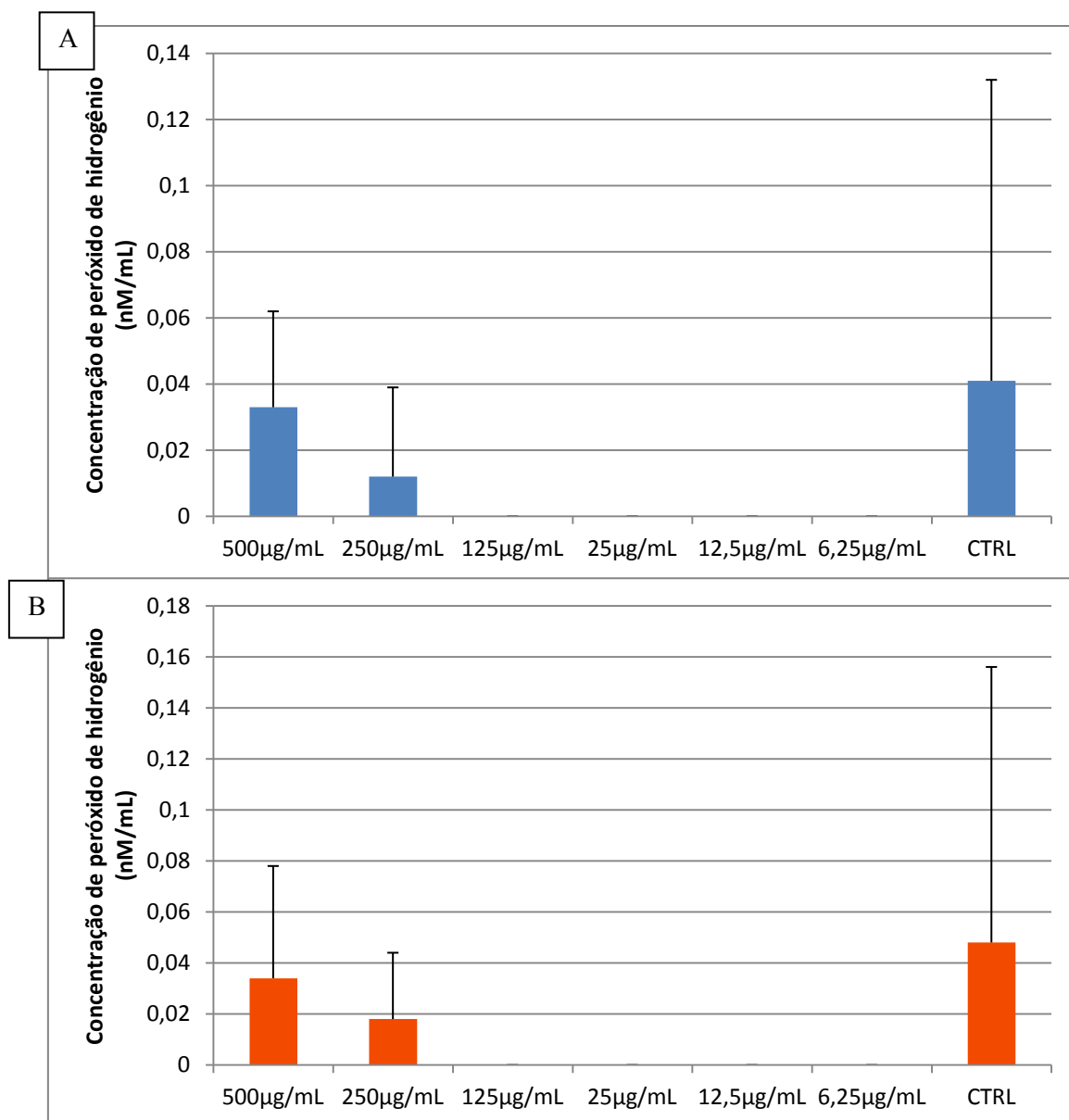


Figura 12- Ensaio de liberação de peróxido de hidrogênio. O ensaio foi realizado 24 horas após o tratamento com PS-PK (A) ou PS-PK e LPS(B). Resultados obtidos em 8 avaliações independentes e expressos em nM/mL.

Entretanto, quando em presença de um agente indutor de H_2O_2 , os resultados se mostraram sensíveis o suficiente para a análise estatística. Comparando-se os resultados do grupo tratado com PS, LPS e PMA, observa-se que as três concentrações mais altas de PS foram significativamente inibitórias no que diz respeito à liberação de H_2O_2 em relação ao controle. Concentrações intermediárias não mostraram diferença significativa em relação a qualquer outro grupo tratado.

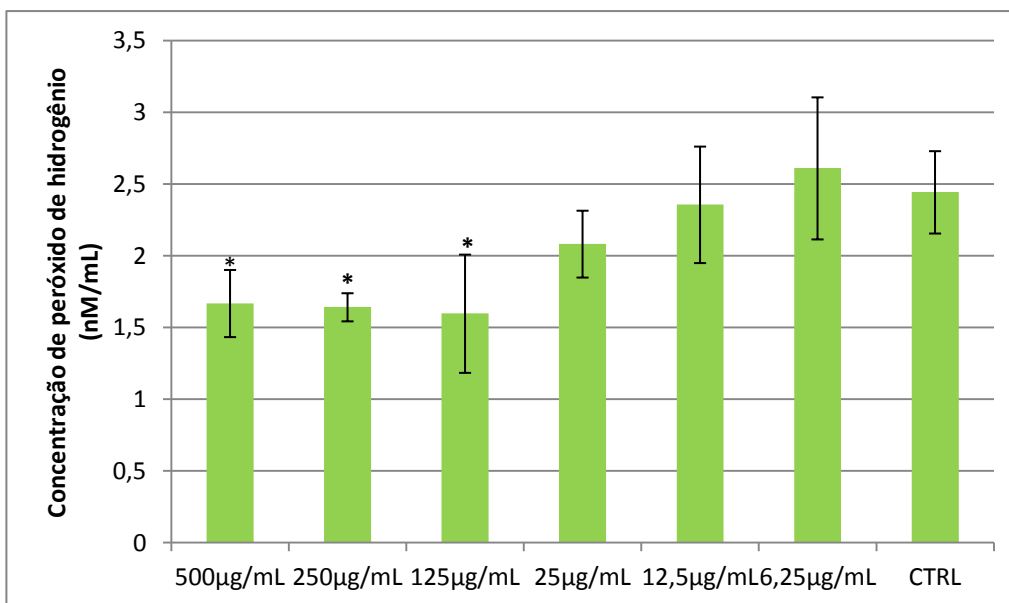


Figura 13- Ensaio de liberação de peróxido de hidrogênio. O ensaio foi realizado 24 horas após o tratamento com PS-PK, LPS e PMA. Resultados obtidos em 8 avaliações independentes e expressos em nM/mL. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle.

Quando o estímulo do LPS foi retirado, observou-se maior concentração de peróxido de hidrogênio no ensaio. As concentrações mais altas de PS levaram a menores concentrações de H_2O_2 quando comparadas ao controle, indicando um efeito inibitório da proteína.

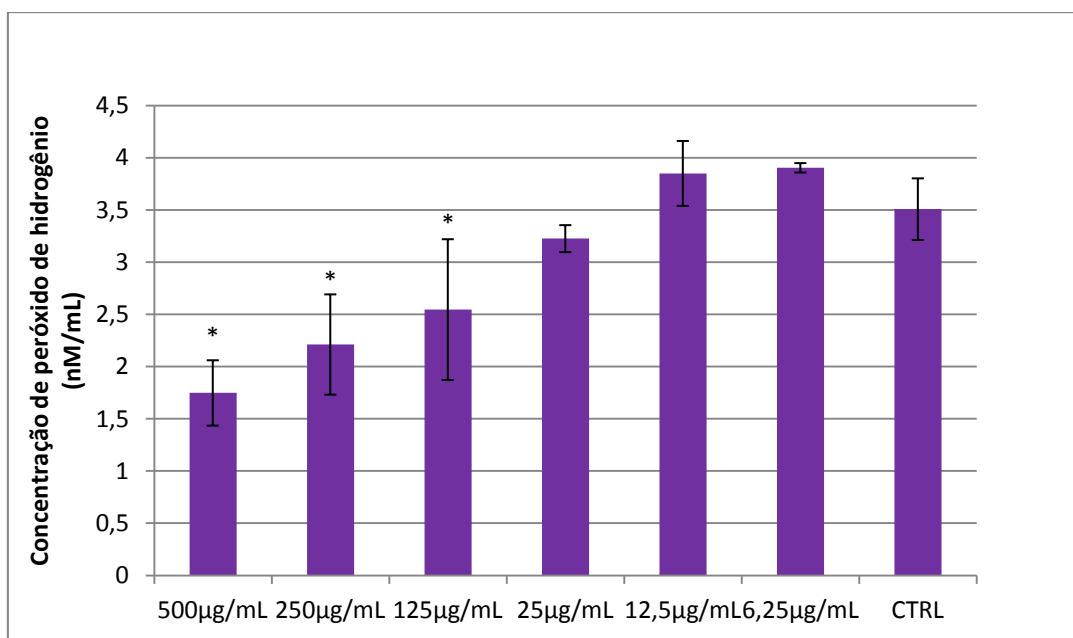


Figura 14- Ensaio de liberação de peróxido de hidrogênio. O ensaio foi realizado 24 horas após o tratamento com PS-PK e PMA. Resultados obtidos em 8 avaliações independentes e expressos em nM/mL. (*) $p < 0,05$ em comparação ao controle.

Levando em conta os resultados como um todo, pode-se concluir que o tratamento com PS inibe a liberação de peróxido de hidrogênio, ação que não é impedida pela adição de LPS à cultura, mas que concorre com a ação do PMA.

Os dados obtidos dos ensaios apenas com PS-Tp mostram que apenas a concentração mais alta utilizada estimulou significativamente a produção e liberação de peróxido de hidrogênio pelos monócitos em relação a todos os outros tratamentos e ao controle ($p<0,001$).

Quando repetidas em presença de LPS, as culturas expressaram resultados semelhantes aos das culturas apenas com PS-Tp, em que a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ estimulou significativamente a produção de peróxido de hidrogênio pelos monócitos em relação a todos os outros tratamentos e ao controle ($p<0,001$).

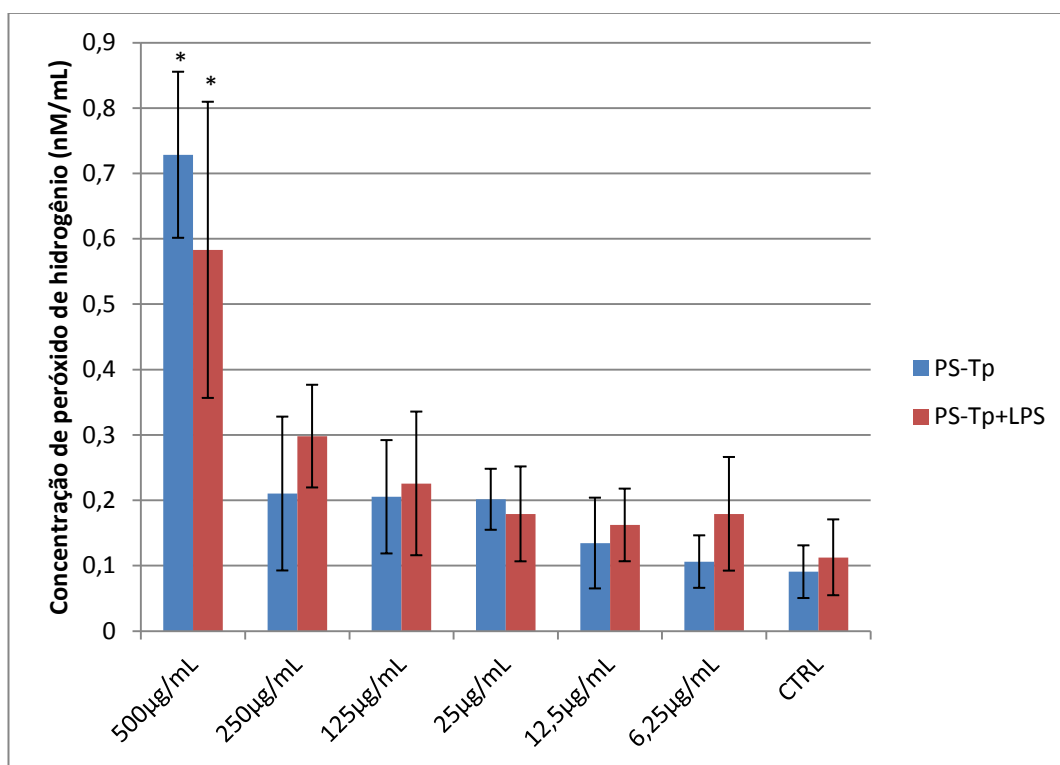


Figura 15- Ensaio de liberação de peróxido de hidrogênio. O ensaio foi realizado 24 horas após o tratamento com PS-Tp ou PS-Tp+LPS. Resultados obtidos em 8 avaliações independentes e expressos em nM/mL. (*) $p<0,001$ em relação ao controle.

As culturas tratadas com PS e LPS e após 24 horas, estimuladas com PMA, tiveram produções de peróxido de hidrogênio muito maiores do que nos ensaios prévios; entretanto,

nenhuma das concentrações estimulou uma liberação de H_2O_2 significativamente maior do que a encontrada no controle, assim como nas culturas tratadas com PS e estimuladas com PMA.

Estes resultados indicam que a PS-Tp é capaz de estimular monócitos a produzir H_2O_2 quando usada em concentrações adequadas (neste experimento pode-se afirmar que a concentração mais alta da proteína foi ideal); também não mostrou interferência sobre a atividade da LPS e do PMA.

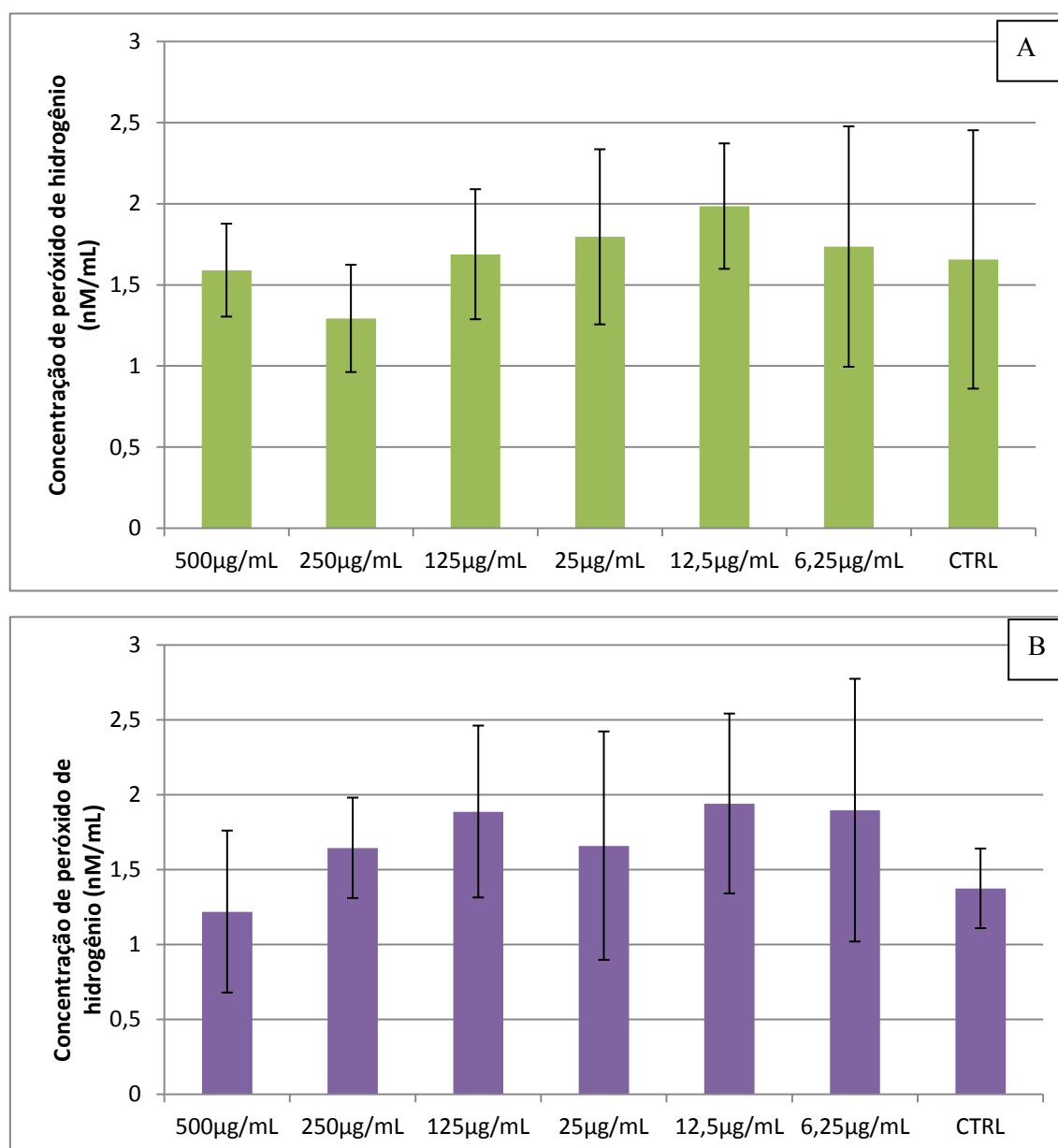
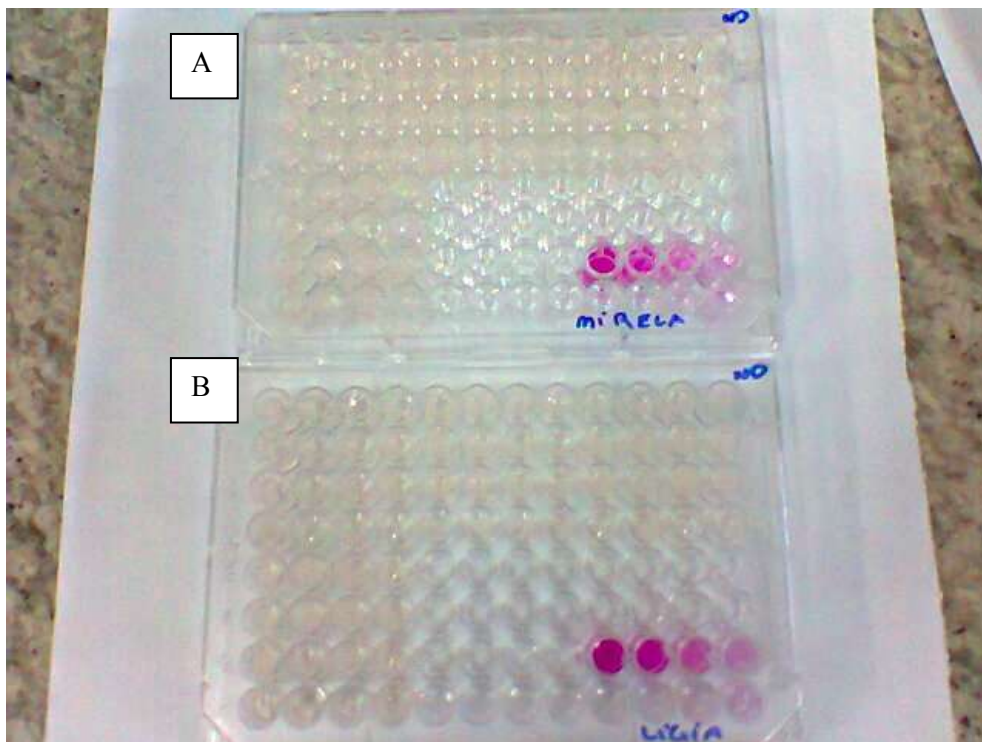


Figura 16 - Ensaio de liberação de peróxido de hidrogênio induzida por LPS+PMA (A) ou PMA (B). O ensaio foi realizado 24 horas após o tratamento com PS-Tp e PMA. Resultados obtidos em 8 avaliações independentes e expressos em nM/mL.

5.4- Determinação de NO das culturas de monócitos

Em nenhuma das avaliações utilizando sobrenadante das culturas de monócitos tratados com PS-PK ou PS-Tp foi possível determinar NO (Foto 1).



5.5 – Determinação de TNF- α dos sobrenadantes de culturas de monócitos.

A análise dos resultados da determinação da produção de TNF- α de culturas de monócitos tratados com PS-PK isoladamente mostrou que apenas a concentração de 125 μ g/mL teve atividade estimulante sobre produção da citocina pelas células ($p < 0,01$), como pode ser visto abaixo (Figura 25-A). Quando em presença do estímulo padrão do LPS, entretanto, a proteína se mostrou fortemente inibitória em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$) (Figura 25-B). Estes resultados indicam que a proteína pode ter interferência no modo de ação do LPS, impedindo sua atividade estimulante sobre a produção de citocina por monócitos.

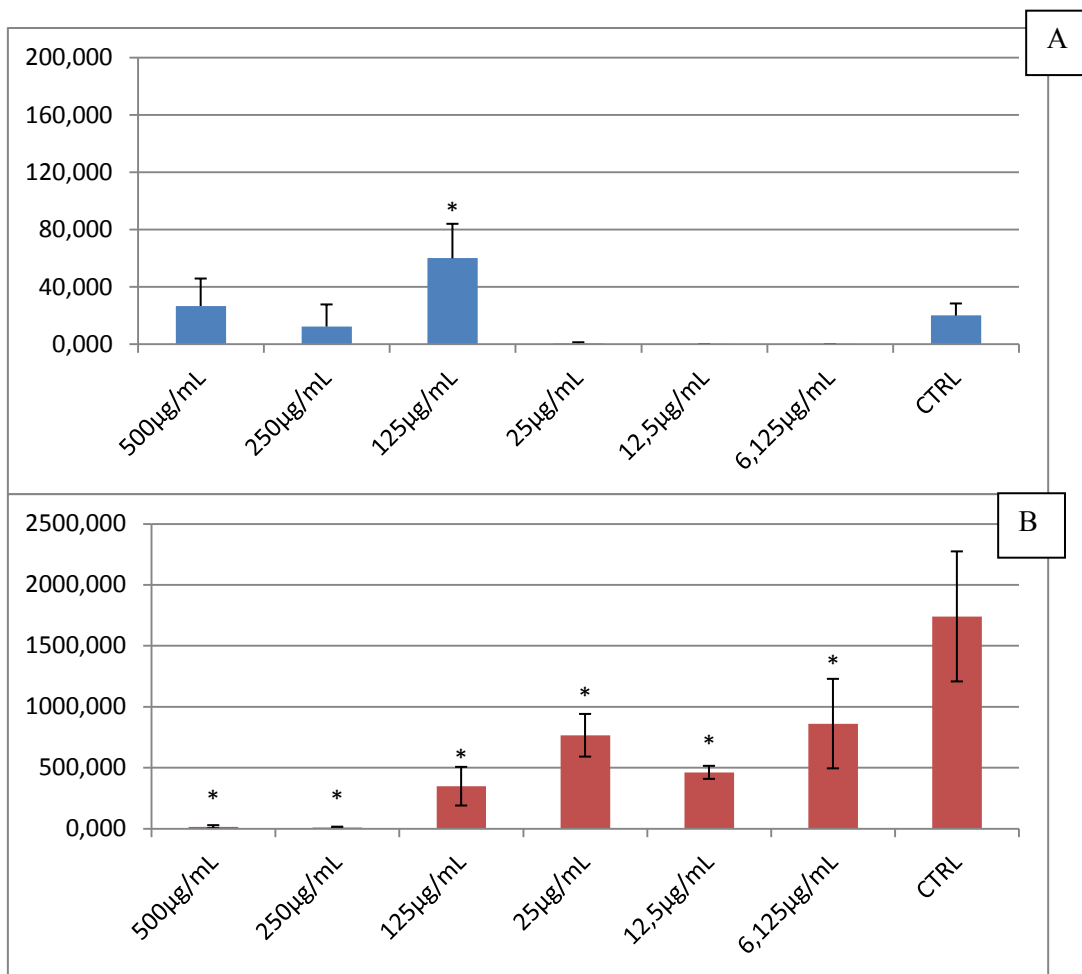


Figura 17- Determinação de TNF- α em sobrenadante de culturas de monócitos, incubados por 24 horas com PS-PK (A) e PS-PK + LPS (B). Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras independentes. (*) $p < 0,01$ em relação ao controle.

O efeito da PS-Tp, entretanto, se mostrou do tipo dose-resposta, visto que a produção de TNF- α aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração da proteína sendo que as concentrações de 500µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL foram significativamente estimulantes ($p < 0,001$), tanto na ausência de LPS quanto na presença. Esta forma de PS, portanto parece estimular monócitos independentemente da atividade do LPS como indutor de produção da citocina.

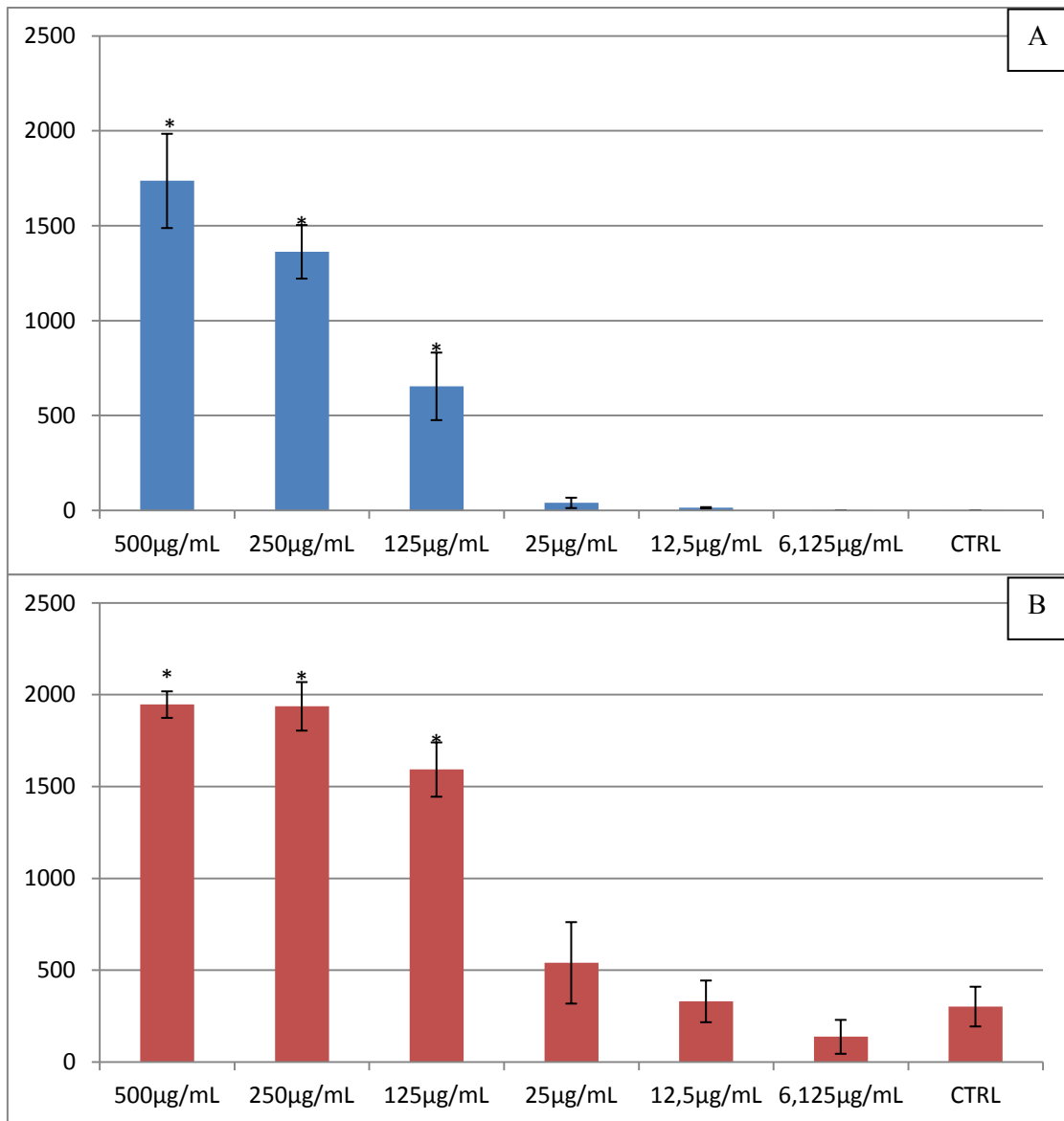


Figura 18 - Determinação de TNF- α em sobrenadante de culturas de monócitos, incubados por 24 horas com PS-Tp (A) e PS-Tp + LPS (B). Dados expressos como concentração de citocina em picogramas por mL (pg/mL). Média $\pm$ SD de 8 amostras independentes. (*) $p < 0,001$ em relação ao controle.

6. DISCUSSÃO

Considerando o potencial de uso das parasporinas como composto bioativo antitumoral, formulamos o presente estudo para avaliar seus efeitos sobre células imunocompetentes. Desse modo, avaliamos a ação de duas preparações de parasporina em diferentes concentrações de cultivo sobre a proliferação de linfócitos, a produção de citocinas e sobre monócitos de indivíduos saudáveis.

Nossos dados indicam que PS-PK e PS-Tp não apresentam atividade mitogênica nem estimulatória da proliferação celular para linfócitos T, uma vez que em nenhum dos experimentos de 72 horas as células proliferaram mais que o controle. Assim sendo, estes resultados poderiam indicar duas possíveis situações: ou que a proteína se apresenta inerte em relação a estas células, ou necessita de mais tempo de interação com elas a fim de ter alguma atividade linfoproliferativa. A manutenção das culturas por um período também não foi suficiente para induzir proliferação celular, indicando ausência de células de memória para qualquer antígeno semelhante à parasporina.

Quando analisamos a produção de citocina por linfócitos tratados, observa-se inibição da produção de IL-10 e IFN- γ nos grupos tratados com 100 μ g/mL de PS-PK por 72 horas, independentemente da presença da ConA. Visto que a viabilidade das células não havia sido comprometida, concluímos ser uma atividade inibitória da toxina. Estes resultados sugerem que a PS-PK pode ter a capacidade de modular negativamente o sistema imune através de sinalização e ativação de outros tipos de células dependentes de seu estímulo. Tal atividade não é interessante no tratamento do câncer, pois, ainda que tenha havido diminuição de secreção de citocina regulatória (IL-10), houve a mesma diminuição de citocina estimulatória (IFN- γ).

A PS-PK também não se mostrou promissora em relação a monócitos, uma vez que foi majoritariamente inibitória em presença ou ausência de LPS e/ou PMA sobre a liberação de peróxido de hidrogênio. Também se mostrou inibidora da produção de TNF- α , o que, aliado à baixa produção de H₂O₂, representa um quadro de inativação de capacidade de fagocitose e eliminação de conteúdo do fagolisossomo, situação extremamente desfavorável à eliminação de células alteradas potencialmente cancerígenas ou já em fase de formação do tumor.

A PS-Tp mostrou o mesmo perfil em relação a linfócitos tratados por 72 horas, mas ao contrário da PS-PK, foi ligeiramente tóxica em 120 horas. Quando determinadas as produções de IL-10, em 72 horas não houve alteração da produção basal, mas houve inibição quando em presença de ConA e em 120 horas. Estes resultados indicam que em situações onde haveria maior proliferação de linfócitos também houve inibição de produção de IL-10. Já em relação a

IFN- γ , a presença de ConA não alterou o perfil de produção, mas a PS-Tp se mostrou inibitória em 72 e 120 horas. Portanto, nenhuma das duas proteínas se mostrou efetivamente estimulante para linfócitos, ainda que também não tenham apresentado toxicidade a eles. Entretanto, a PS-Tp se mostrou mais vantajosa em relação à PS-PK por sua clara capacidade de ativação de monócitos, visto que houve estimulação da produção de peróxido de hidrogênio tanto isoladamente quanto em presença de LPS. Também observamos ativação da produção de TNF- α . Entretanto, tal ação pode não ser favorável ao hospedeiro.

Assim, embora as parasporinas tenham ação citotóxica direta sobre células tumorais [5] seu uso no combate a tumores parece ficar limitado devido às ações deletérias sobre células imunocompetentes. Essa visão é sustentada por resultados recentemente obtidos em modelo experimental *in vivo*, na qual a administração de parasporina mostrou-se imunotóxica e hepatóxica.

7. CONCLUSÕES

As preparações de parasporina estudadas não mostraram atividade imunomoduladora favorável à ação antitumoral, exigindo estudos mais aprofundados sobre essa ação sobre células imunocompetentes, tanto *in vitro* quanto *in vivo* para sustentar seu potencial de uso antitumoral, visto que tanto H_2O_2 quanto o TNF- α estão associados a processos inflamatórios frequentemente associados a progressão tumoral [16].

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer research*. 2009 Jan;29(1):427-33.
- [2] Bulla LA, Jr., Kramer KJ, Davidson LI. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of bacteriology*. 1977 Apr;130(1):375-83.
- [3] Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, et al. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Sep 8;281(36):26350-60.
- [4] Yasutake K, Binh ND, Kagoshima K, Uemori A, Ohgushi A, Maeda M, et al. Occurrence of parasporin-producing *Bacillus thuringiensis* in Vietnam. *Canadian journal of microbiology*. 2006 Apr;52(4):365-72.
- [5] Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, et al. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004 May 14;279(20):21282-6.
- [6] Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, et al. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2000 Jul;7(4):625-34.
- [7] Lee D, Katayama H, Akao T, Maeda M, Tanaka R, Yamashita S, et al. A 28 kDa protein of the *Bacillus thuringiensis* serovar shandongiensis isolate 89-T-34-22 induces a human leukemic cell-specific cytotoxicity. *Biochimica et biophysica acta*. 2001 May 5;1547(1):57-63.
- [8] Krishnan K, Ker JE, Mohammed SM, Nadarajah VD. Identification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. *Journal of biomedical science*. 17:86.
- [9] Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, et al. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca^{2+} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration in toxin-sensitive cells. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Mar 9;282(10):7742-52.

[10] Abe Y, Shimada H, Kitada S. Raft-targeting and oligomerization of Parasporin-2, a bacillus thuringiensis crystal protein with anti-tumour activity. *Journal of biochemistry*. 2008 Feb;143(2):269-75.

[11] Kitada S, Abe Y, Maeda T, Shimada H. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. *Toxicology*. 2009 Oct 1;264(1-2):80-8.

[12] Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, Mizuki E. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. *Biochimica et biophysica acta*. Jun;1808(6):1476-82.

[13] Lamm DL, Riggs DR. Enhanced immunocompetence by garlic: role in bladder cancer and other malignancies. *The Journal of nutrition*. 2001 Mar;131(3s):1067S-70S.

[14] Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. 1981;46(2):211-26.

[15] Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Dec;78(12):7764

[16] Sergei I. Grivennikov Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology*. 2012 Nov