UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

POLIANA DE PAULA BRITO

**Influência do ácido indol-3-acético na capacidade
fagocitária e na integridade celular de neutrófilos de
ratos**

Pirassununga
2006

POLIANA DE PAULA BRITO

**Influência do ácido indol-3-acético na capacidade fagocitária
e na integridade celular de neutrófilos de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Pirassununga
2006

Mas é preciso ter *força*, é preciso ter *raça*, é preciso ter *gana* sempre ...

Mas é preciso ter *manha*, é preciso ter *graça*, é preciso ter *sonho* sempre.

Quem traz na pele essa marca possui a estranha mania de ter *fé* na **VIDA!!!**

(Milton Nascimento e Fernando Brant)

Dedico esta vitória à minha família...

Ao meu pai que me ensinou a ser justa, honesta e curiosa... À minha linda e querida mãe que me ensinou a amar, a ser humilde, forte e a sempre ter um sorriso no rosto... Ao meu irmão Edgard, que sempre me guiou pelo caminho da verdade e do bem com muita fantasia... Ao meu irmão Nano, que sempre me animou e me alegrou... Ao meu Morr Marcelo, por me amar... E às minhas eternas amigas caninas (Tulla, Duda e Kika) por um amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela força na superação dos obstáculos.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mariza Pires de Melo pela oportunidade, confiança depositada e por todos os ensinamentos.

À Silvana Marina Piccoli Pugine pelo apoio, profissionalismo e acima de tudo pela grande amizade.

Às amigas, Prof^a. Dr^a. Andréa Rentz Ribeiro e Prof^a. Dr^a. Cláudia Ribeiro do Valle, minhas incentivadoras.

Ao Antônio Fernandes dos Santos Jr (China) pela amizade e colaboração no manuseio com os animais.

Aos estagiários do Laboratório de Química Biológica, Mariana, Dimas, Tatiane, Lívia, Mirian, Natália, e Lucas pelo empenho, companheirismo e trabalho em equipe.

Ao Prof. Dr. Ernane José Xavier Costa pela colaboração nos experimentos.

À Vânia pelo carinho e apoio.

À PUC - Minas e ao Prof. Clodoaldo Coutinho P. Fonseca pela doação de animais.

À Dr^a. Heliana Gomes de Azevedo e a Comissão Nacional De Energia Nuclear - CNEN - Laboratório de Poços de Caldas, pelo incentivo e pela disponibilização do microscópio de Fluorescência.

Ao Prof. Dr. Antônio Joaquim Rossini pela gentileza em emprestar a escala de Mac Farland.

Ao Prof. Dr. Flávio Meirelles por disponibilizar o microscópio de Fluorescência.

À Giovana Krempel Fonseca Merighe pela atenção e disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Rui Curi e a Dr^a. Tatiana Carolina Alba pelas análises no citômetro de fluxo.

À Conceição, secretária da pós-graduação pela atenção.

Ao Marcelo e todo pessoal da biblioteca da FZEA/USP.

Aos colegas da Pós-graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que ajudaram, diretamente ou indiretamente.

MUITO OBRIGADA !!!

RESUMO

BRITO, P. P. Efeito da Suplementação de Ácido Indol Acético na Morte Bacteriana e na Integridade Celular de Neutrófilos de Ratos. 2006. 61 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassunga, 2006.

O Ácido Indol Acético (AIA) é um hormônio, denominado auxina e há uma correlação direta entre o efeito citotóxico do AIA e da atividade da peroxidase nas células animais. Os Neutrófilos apresentam uma alta atividade de peroxidase e o AIA gera uma mudança ultra-estrutural e morte destas células em cultura. Entretanto, estudos *in vivo* mostram que a administração de AIA em baixas doses não promove um efeito prooxidante em neutrófilos e esta suplementação aumenta o englobamento de partículas de Zymosan por estas células. No presente estudo foram avaliados os efeitos da administração do AIA na capacidade fagocitária e na integridade celular de neutrófilos de ratos, observando os seguintes parâmetros: i) capacidade fagocitária - englobamento e morte de *Staphylococcus aureus*; ii) integridade celular - integridade da membrana plasmática, fragmentação de DNA e potencial transmembrana mitocondrial e iii) atividade de mieloperoxidase. O tratamento aplicado com AIA não apresentou alteração significativa na capacidade de englobamento e morte de *S. aureus* pelos neutrófilos quando aos controles. A integridade celular e atividade de mieloperoxidase nos neutrófilos não foram alteradas pela suplementação com AIA comparadas aos controles. A administração de AIA em baixas doses não mostrou efeito na morte de *S. aureus* pelos neutrófilos o mesmo também não alterou a integridade celular e a atividade da mieloperoxidase destas células.

Palavras-chave: Fagocitose, *Staphylococcus aureus*, Fragmentação de DNA, Mieloperoxidase, Auxina.

ABSTRACT

BRITO, P. P. **Influence of indole-3-acetic acid supplementation on the bacterial killing and cellular integrity on rat's neutrophils.** 2006. 61 f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

Indole acetic acid is (IAA) a hormone termed auxins and there is a direct correlation between the cytotoxic effect of IAA and the peroxidase activity of the animal cells. Neutrophils present a higher peroxidase activity and the IAA leads to marked ultra structural changes and death on these cells in culture. However studies *in vivo* show that IAA administration at low doses does not promoting a prooxidant effect on neutrophil and this supplementation to increase of the engulfment of Zymosan particles by these cells. In present study were evaluated the effect of IAA administration in the phagocytic capacity and cellular integrity on rat's neutrophils from the following parameters: i) phagocytic capacity - engulfment and killing of the *Staphylococcus aureus*, ii) cellular integrity - plasma membrane integrity, DNA fragmentation and mitochondrial transmembrane potential and iii) myeloperoxidase activity. The IAA treatment imposed did not show another significant alteration in the *S. aureus* engulfment and killing capacity by neutrophils to compare with controls. The cellular integrity and myeloperoxidase activity in the neutrophils did not have alteration by IAA supplementation to compare with the controls. In conclusion the IAA administration at low doses did not show effective action in *S. aureus* killing by neutrophils and the same time as did not alter the cellular integrity and myeloperoxidase activity by this cell.

KEYWORDS: Phagocytosis; *Staphylococcus aureus*; DNA fragmentation; Myeloperoxidase; Auxin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Esquema apresentando os mecanismos de lise bacteriana, oxigênio dependente e oxigênio independente, executado pelos neutrófilos. Adaptado de Mayer-Scholl, Averhoff e Zychilinsky (2004).21
- Figura 2 - Configuração de um citômetro de fluxo. Adaptado de Silva, et al. (2004).28
- Figura 3 - Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual das células (eventos) é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina (*sheat fluid*). Adaptado de Silva, et al. (2004).29
- Figura 4 - Avaliação da viabilidade celular dos neutrófilos em microscopia óptica (40x), utilizando azul de Trypan como corante: campo apresentando células viáveis (amarelas) e inviáveis (azuis).....33
- Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular dos neutrófilos em microscopia óptica (40x), utilizando azul de Trypan como corante: campo apresentando 100% de células viáveis (amarelas).....33
- Figura 6 - Neutrófilos de ratos em microscopia de fluorescência, utilizando a coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.....40
- Figura 7 - Início do processo de fagocitose: neutrófilo com cocos aderidos na membrana. Microscopia de fluorescência, utilizando coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.41

- Figura 8 - Fagocitose: Neutrófilo apresentando cocos fagocitados . Microscopia de fluorescência, utilizando a coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.41
- Figura 9 - Término da Fagocitose: neutrófilo com cocos fagocitados e mortos (vermelho). Microscopia de fluorescência, utilizando a coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.42
- Figura 10 - Efeito da administração de AIA na capacidade de englobamento de *Staphylococcus aureus*, recém cultivados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.....43
- Figura 11 - Efeito da administração de AIA na lise de *Staphylococcus aureus*, recém cultivados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.43
- Figura 12 - Efeito da administração de AIA na capacidade de englobamento de *Staphylococcus aureus*, sensibilizados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.....44
- Figura 13 - Efeito da administração de AIA na lise de *Staphylococcus aureus*, sensibilizados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2

(T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente. 45

Figura 14 - Efeito da administração de AIA na integridade de membrana plasmática de neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente..... 46

Figura 15 - Efeito da administração de AIA na integridade de DNA de neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente. 47

Figura 16 - Efeito da administração de AIA na polarização de membrana mitocondrial de neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T4) deste ácido por kg de massa corporal diariamente..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade de mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos, comparando o grupo controle com os grupos tratados com 1 mg (T1), 18 mg (T2) e 40 mg (T3) de ácido indol-3-acético por Kg de massa corporal diariamente.....	49
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Neutrófilos	18
2.2 Ácido indol-3-acético	22
2.3 Integridade celular	25
2.4 Uso da citometria de fluxo na avaliação da Integridade Celular	26
3 OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS:	31
4.1 Animais	31
4.2 Preparação e administração de AIA	31
4.3 Células	32
4.4 Verificação da capacidade fagocitária dos neutrófilos	34
4.4.1 Preparação da bactéria	34
4.4.2 Ensaio de fagocitose	34
4.4.3 Coloração com laranja de acridina ou "acridine orange"	35
4.5 Verificação da integridade celular dos neutrófilos	36
4.5.1 Integridade de membrana celular	37
4.5.2 Análise da fragmentação de DNA	37
4.5.3 Análise da polarização da membrana mitocondrial	38

4.6 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	39
4.7 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando <i>Staphylococcus aureus</i>	40
5.2 Avaliação da toxicidade celular do ácido indol-3-acético.....	45
5.3 Avaliação da enzima mieloperoxidase nos neutrófilos.....	48
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

Para um melhor desempenho na produção animal, é preciso vários cuidados com os animais, principalmente com relação ao bom funcionamento do organismo. Sabe-se hoje em dia que a prevenção é melhor que o tratamento de uma infecção já instalada, e para isso é necessário que se pesquisem novas substâncias que possam atuar aumentando ou evitando que a imunidade do animal seja prejudicada.

O intervalo entre o desenvolvimento e a utilização prática das inovações geralmente demanda vários anos. Na primeira etapa, estudos laboratoriais demonstram a potencialidade de utilização do produto. A segunda etapa envolve a viabilização de uso prático, com o desenvolvimento de processos industriais economicamente viáveis. As próximas etapas estão relacionadas à divulgação, comercialização e amadurecimento do projeto tecnológico. Atualmente, vários aditivos biotecnológicos são rotineiramente usados na indústria de alimentação animal. Para uma tecnologia ser adotada ela necessita ser comprovada cientificamente e testada em condições de campo (FERNANDES, 2003).

Os neutrófilos são componentes essenciais na resposta inflamatória e na resolução de uma infecção bacteriana. Quando esta célula encontra uma bactéria ela engloba este microrganismo, formando um fagossomo, havendo posteriormente fusão com grânulos intracelulares, formando o fagolisossomo. No fagolisossomo, a bactéria é morta por ação de enzimas, peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

O ácido indol-3-acético (AIA), é um hormônio de crescimento de plantas, largamente encontrado nos brotos. Sua síntese ocorre, principalmente a partir

do triptofano (GORDON; BARR; FRY, 1972; MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991). Ele também pode ser encontrado nos fungos, nas bactérias (PRINSEN et al., 1991) e nos animais. Neste último, a ação deste vem sendo pesquisada em vários órgãos e com diferentes funções.

A produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio encontram-se aumentados em neutrófilos e macrófagos cultivados na presença de AIA (DE MELO et al., 1998). Além disso, o metabolismo de glicose e glutamina encontram-se aumentados em células ricas em peroxidase como os neutrófilos e macrófagos inflamatórios e não é alterado em células com baixa atividade de peroxidase como os linfócitos (DE MELO; PHITON-CURI; CURI, 2004).

Concomitante, não está esclarecida a concentração de AIA presente no organismo para quaisquer aplicações sem provocar lesões nas células ou em seus componentes, principalmente as do sistema imune, como os neutrófilos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são células do sistema mielóide, derivados da medula óssea. Todas as células da medula óssea possuem um citoplasma preenchido com grânulos, de maneira que são coletivamente chamadas de granulócitos. Além disso, essas células do sistema mielóide possuem núcleos caracteristicamente lobulados e irregulares e são descritas como polimorfonucleares em oposição aos núcleos arredondados e únicos das células mononucleares (TIZARD, 2002). Os neutrófilos distinguem de outros polimorfonucleares por apresentarem núcleos multilobulados e grânulos citoplasmáticos distintos. Estes incluem grânulos primários ou azurófilos, secundários ou específicos e grânulos terciários, os quais contêm enzimas, proteínas e glicosaminoglicanos que se acredita participar de muitas funções do neutrófilo (HELLEWELL; WILLIAMS, 1994). Nos esfregaços sanguíneos, os grânulos de neutrófilos não absorvem nem corantes básicos (hematoxilina), como os basófilos; nem corantes ácidos (eosina), como os eosinófilos, sendo por isso chamados de neutrófilos (TIZARD, 2002).

Os neutrófilos constituem cerca de 60 a 75% dos leucócitos sanguíneos nos carnívoros, mas somente cerca de 20 a 30% nos ruminantes, tais como os bovinos e ovinos, e roedores de laboratório. Na circulação, há dois conjuntos de neutrófilos, um conjunto circulante e um conjunto de células seqüestradas na microvasculatura. Eles são componentes essenciais do processo inflamatório agudo e são responsáveis pela resolução da infecção microbiana (MAYER-

SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004). Durante infecções bacterianas pode haver aumento em cerca de 10 vezes no número de neutrófilos circulantes à medida que forem liberados da medula óssea. (TIZARD, 2002).

Quando a bactéria se encontra com o neutrófilo, ele a engloba, sendo este processo denominado de fagocitose. Embora a fagocitose seja um processo contínuo, pode ser dividida em quatro estágios distintos: quimiotaxia, aderência, ingestão e digestão. A quimiotaxia é a migração direcionada dos neutrófilos. Eles migram no momento em que são atraídos em direção à origem de determinados produtos químicos, no interior dos tecidos, que são produzidos com a invasão bacteriana pela lesão tecidual. A aderência não acontece espontaneamente, pois tanto as células como as bactérias possuem carga negativa e assim se repelem entre si. A carga negativa na bactéria deve ser neutralizada por meio da ligação de uma proteína positivamente carregada. Os exemplos de tais proteínas carregadas incluem as moléculas de anticorpo e a proteína denominada C3b, o terceiro componente do sistema complemento. As bactérias ligadas a anticorpos, por exemplo, apresentam redução da carga superficial e, então, podem se ligar negativamente com os neutrófilos carregados. Os anticorpos, as principais proteínas do sistema imune, são de longe as opsoninas mais eficientes (TIZARD, 2002). Além disso, utilizam estruturas da superfície dos patógenos como lipopolissacarídeos e proteoglicanos para facilitar diretamente esta aderência (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Quando um neutrófilo encontra uma bactéria, o pseudópodo flui por cima e ao redor da bactéria, e ocorre uma ligação entre as opsoninas e o receptor do neutrófilo. Uma vez ligada à superfície dos neutrófilos, a bactéria é empurrada para o interior da célula, à medida que o citoplasma a engloba, esta fica presa a um vacúolo chamado de fagossomo (TIZARD, 2002; MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

Após a ingestão, com formação do fagossomo, inicia-se o processo de morte bacteriana. Os agentes citotóxicos são tradicionalmente divididos em mecanismos oxigênio dependente e oxigênios independentes (Figura 1). Ambos os sistemas colaboram para a morte microbiana. O mecanismo oxigênio independente contém proteases características, proteínas e peptídeos antimicrobianos e enzimas. Proteínas microbianas como as defensinas e a enzima lisozima, possuem a função de alterar a superfície aniônica das bactérias, deixando a bactéria mais permeável. Proteases como a elastase e as catepsinas, degradam as proteínas bacterianas, incluindo os fatores de virulência (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

O segundo mecanismo de morte bacteriana é o oxigênio dependente. É através deste mecanismo que os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($HO\cdot$), ânion superóxido (O_2^- ou $O_2^{\cdot-}$) e o oxigênio singlete (PICK; MIZEL, 1981), resultando em uma seqüência de reações bioquímicas denominadas de explosão oxidativa ou *burst* oxidativo.

Após o englobamento, os neutrófilos iniciam um *burst* oxidativo, onde a NADPH oxidase, presente na membrana do fagossomo, produz O_2^- , o qual é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase. A quantidade de H_2O_2 produzido pelo fagolisossomo de neutrófilo não é suficiente para eliminar totalmente as bactérias e outros microrganismos. Contudo, a enzima mieloperoxidase (MPO) produzida nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, na presença deste H_2O_2 , oxida íons cloreto (Cl^-) em ácido hipocloroso ($HOCl$) que possui uma atividade antimicrobiana mais eficaz. Assim, uma das técnicas mais utilizadas para análise da atividade neutrofílica é a mensuração da atividade de MPO (ODA et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Outro produto formado é o radical hidroxil que é muito eficiente na lise bacteriana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Figura 1 - Esquema apresentando os mecanismos de lise bacteriana, oxigênio dependente e oxigênio independente, executado pelos neutrófilos. Adaptado de Mayer-Scholl, Averhoff e Zychilinsky (2004).

Os leucócitos polimorfonucleares possuem alta atividade de peroxidase e apresentam uma importante função eferente (fagocitose e degranulação) e aferente (liberação de citocinas imunológicas) ligadas às respostas imunológicas. A fagocitose e a degranulação são as funções primárias dessas células, em que os microrganismos e/ou partículas são fagocitadas e digeridas por uma combinação de enzimas e/ou espécies reativas de oxigênio (TERR et al., 2001). A explosão oxidante dada pela atividade fagocitária e secretória dos neutrófilos estão associadas ao aumento do consumo de oxigênio, glicose e glutamina (PITHON-CURI et al., 1998). O consumo de metabólitos está relacionado também com a alta atividade metabólica dessas células, seja para gerar energia ou metabólitos de reposição (PITHON-CURI et al., 1997). Essas células também possuem um

eficiente sistema antioxidante enzimático para autoproteção contra as espécies reativas de oxigênio, pela ação da catalase e do ciclo da glutathione peroxidase-glutathione reductase o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos, respectivamente, são conduzidos a compostos com baixos poderes oxidantes (FERREIRA et al., 2004).

2.2 Ácido indol-3-acético

O ácido indol-3-acético (AIA) é uma substância produzida em baixas concentrações nas plantas, sendo responsável pelo crescimento e desenvolvimento destas. É conhecido como hormônio de crescimento de plantas ou auxina, devido sua função regulatória nos processos de divisão, elongação e diferenciação de células (OLSSON, 1998). O AIA é largamente distribuído nos brotos, folhas jovens, flores e frutos das plantas (GORDON; BARR; FRY, 1972).

O AIA também é encontrado nos fungos e nas bactérias, cuja função não está bem esclarecida. Há casos em que a simbiose entre o microrganismo e a planta favorece o crescimento do vegetal (PRINSEN et al, 1991).

Nos animais os estudos iniciaram a partir da identificação de AIA na urina humana (KOGL; HAGEN-SMITH; ERXLEBEN, 1933), seguida de sua detecção no líquido cefalorraquidiano (BERTILSSON; OALMER, 1972), no plasma (MARTINEZ ET AL., 1993), e diversos tecidos como os de pulmão, rim, fígado e cérebro (MIRSKY; DIENGOTT, 1956; TUSELL et al., 1984). Entretanto, não há evidências contundentes de uma função fisiológica do AIA nos animais.

A sua síntese ocorre principalmente a partir do triptofano produzida nas células vegetais, animais e em alguns microrganismos (GORDON; BARR; FRY, 1972; MILLS; FINLAY; HADDAD, 1991). Nos animais, a obtenção de AIA pode ser devida a duas vias: síntese a partir do triptofano em diferentes tecidos (GORDON; BARR; FRY, 1972); ou absorção intestinal devido sua síntese a partir do triptofano promovida pelas bactérias intestinais ou devido à ingestão de alimentos ricos em AIA como os vegetais ou derivados fermentados do leite ou da uva (WEISSABACH et al., 1959; MARTINEZ et al., 1993; FERREIRA et al., 2004).

A concentração de AIA nos tecidos e fluidos de ratos e camundongos é proporcional a dieta rica em triptofano e dependente da ação das bactérias intestinais. A administração intravenosa de AIA na dose de 50 mg/Kg de massa do animal mostra uma resposta hipoglicêmica aguda em 5 minutos (SULLIVAN; STRONG, 1958; FULLER et al., 1971). A administração de AIA nesta dose, ou superior, causa também irritabilidade, fraqueza nas patas e miotonia (FULLER et al., 1971), lassitude e imobilidade, deformação de fetos (JOHN et al., 1979) e aumento do número de fibroblastos (SINNA, 1983).

Sabe-se que o AIA atua como antioxidante na preservação de sêmem (TONIOLLI et al., 1998) e estudos mostram que este composto apresenta características antioxidantes semelhantes a outros compostos indólicos como a melatonina (CANO; ALCARAZ; ARNAO, 2003; CELIK; TULUCE, 2006). Outros autores mostraram que o AIA age como antiinflamatório tópico em edema de orelha em camundongo (JONES; ABDALLA; FREITAS, 1995). Entretanto, estudos em cultura de células mostraram que na presença de peroxidase - seja a peroxidase de raiz forte ou a mieloperoxidase presente em neutrófilos e macrófagos inflamatórios - este composto atua como um prooxidante avaliado pelo aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (CANDEIAS et al., 1994; CANDEIAS; WARDMAN; MASON, 1997), pela sua citotoxicidade (DE

MELO et al., 1997; FOLKES; WARDMAN, 2001; DE MELO et al., 2004) indução da peroxidação lipídica e lesões em ácidos nucléicos (FOLKES et al., 1999).

O estresse oxidativo causado pelo sistema AIA-peroxidase compõe a base dos estudos e emprego deste sistema na terapia do câncer ("enzyme/produg") (GRECO et al., 2000; FOLKES; WARDMAN, 2001; WARDMAN, 2002), e da proposta de aumento da atividade microbicida por neutrófilos e macrófagos em cultura (DE MELO et al., 1998). Huang, et al., 2005, concluíram de seus estudos que a combinação de AIA e peroxidase de raiz forte pode inibir o crescimento de câncer pancreático *in vitro* por induzir apoptose, ao qual ele associou com o aumento de radicais livres.

Os neutrófilos apresentam uma alta atividade de peroxidase, sendo esta maior que nos macrófagos inflamatórios e macrófagos residentes. Já os linfócitos apresentam uma baixa atividade de peroxidase (DE MELO et al., 1997; DE MELO et al., 1998). A produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio encontram-se aumentados em neutrófilos e macrófagos cultivados na presença de AIA (DE MELO et al., 1998). Além disso, o metabolismo de glicose e glutamina encontram-se aumentados em células ricas em peroxidase como os neutrófilos e macrófagos e não é alterado em células com baixa atividade de peroxidase como os linfócitos (DE MELO; PHITON-CURI; CURI, 2004).

Lins et al, 2006 estudaram o efeito da administração de AIA na função e no estresse oxidativo de neutrófilos e relataram que a atividade fagocitária de neutrófilos por partículas de Zymosan aumentou significativamente (51% em comparação ao controle) em ratos que receberam AIA por via subcutânea. Entretanto, a geração de H_2O_2 por estas células não apresentou alteração frente ao tratamento com AIA. Concomitantemente, Oliveira et al., 2006 observaram que o AIA não apresentou ação oxidante em fígado de ratos que receberam esta auxina via subcutânea ou intragástrica (gavagem); além de constatarem que não houve diferença entre as duas vias de administração de AIA, subcutânea ou

intragástrica e, ainda, a suplementação com AIA promoveu redução na atividade de catalase neste órgão sugerindo uma ação antioxidante para este composto.

2.3 Integridade celular

Dois modelos distintos de morte celular têm sido observados em células eucarióticas: apoptose e necrose (ARENDS; WYLLIE, 1991). A necrose, também chamada de morte celular patológica ou acidental, ocorre quando as células são expostas a uma variação extrema de suas condições fisiológicas (como hipertermia, hipoxia, etc.) danificando a membrana plasmática e conseqüentemente levando a morte celular. Já a apoptose é um importante mecanismo celular, tanto no desenvolvimento quanto na homeostase de tecidos adultos com o objetivo de remover células infectadas, danificadas ou transformadas, pela ativação de um programa de autodestruição celular intrínseco e controlado. A apoptose pode ser iniciada por sinais intrínsecos como danificação de DNA ou por ação de glicocorticóides, ou extrínsecos, choque térmico, citostáticos e radiação por UV (THOMPSON, 1995).

Uma vez ativada a fase de execução da apoptose o processo progride rapidamente através da ativação de complexos enzimáticos em cascata. No núcleo a cromatina condensa e degrada-se e agrega-se na periferia nuclear. Em simultâneo com a condensação da cromatina, a ultra-estrutura nuclear é alterada e a fragmentação do núcleo ocorre. Outras organelas citoplasmáticas, como a mitocôndria, permanecem estruturalmente intactas embora ocorram alterações bioquímicas. A redução do potencial eletroquímico mitocondrial, o

desacoplamento entre a transferência de elétrons e a síntese de ATP e o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (KROEMER; DALLAPORTA; RESCHE-RIGON, 1998), leva a uma disfunção geral da mitocôndria. A integridade da membrana plasmática fica comprometida por uma alteração de assimetria fosfolipídica (exposição de fosfatidilserina). Há ainda uma perda das microvilosidades e das junções célula-célula. A célula toma uma forma arredondada, dissocia-se das vizinhas e diminui dramaticamente de volume (saída de água), lançando protuberâncias para o exterior que se separam como corpos apoptóticos. Nos tecidos, os corpos apoptóticos são reconhecidos, em parte pela exposição da fosfatidilserina, e rapidamente fagocitados (GONÇALVES, 1998).

A apoptose nos neutrófilos é acompanhada por uma queda nas funções vitais da célula, como: redução na capacidade de responder aos estímulos, redução na intensidade de fagocitose (perda total da capacidade de fagocitose) e decréscimo no processo de degranulação e *burst* oxidativo (WHYTE et al., 1993). Entretanto, estas funções são muito importantes para manter uma boa defesa do organismo e este poder reagir às possíveis invasões de agentes infecciosos (SLADEK et al., 2005).

2.4 Uso da citometria de fluxo na avaliação da Integridade Celular

A citometria de fluxo é uma técnica que simultaneamente mensura e analisam as múltiplas características físicas de partículas simples, geralmente de células, suspensas em um sistema de fluxo (SILVA, 2003). Esta particularidade é uma das diferenças existentes entre a citometria de fluxo e outras técnicas de

análises quantitativas, que necessitam da fixação da partícula a uma superfície (por exemplo, lâmina). A medição em fluxo permite análises em altas velocidades (10^2 , 10^3 partículas por segundo) e garantem que as características analisadas sejam selecionadas aleatoriamente de toda população, sem qualquer subjetividade associada (DOLEZEL, 1997a; SILVA et al., 2004).

O citômetro de fluxo é um sistema constituído por cinco elementos: fonte(s) de radiação, (lâmpada de mercúrio ou laser); uma câmara de fluxo; unidades de filtros ópticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico a partir de uma gama espectral mais vasta; fotodiodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível e processamento dos sinais com interesse e uma unidade que processa os dados recolhidos (Figura 2). A suspensão celular é injetada e atravessa a câmara onde se dá a passagem célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. A passagem individual das células é obtida através da focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra, sendo esta injetada no seio de uma solução (*sheath fluid*) que também atravessa a câmara (Figura 3) (SILVA et al., 2004).

A diferença de velocidade entre os dois fluidos faz com que o fluxo se processe em regime laminar. A velocidade de escoamento da solução revestida (*sheath fluid*) é superior à amostra, e ajustável, o que permite reduzir e controlar a espessura da solução da amostra de forma que possa passar uma célula de cada vez (SILVA et al., 2004).

O feixe de radiação ao interceptar a partícula (célula) na câmara, sofre dispersão quer na direção frontal (*forward scattering*), quer na lateral (*side scattering*). A radiação assim dispersa é detectada diretamente por fotodiodos (dispersão frontal) ou pode ser desviada a 90° por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos focando-a para fotomultiplicadores. A combinação destes tipos de radiação dispersa revela informações importantes tais como a dimensão celular, a granularidade/complexidade e a morfologia (CÔRTE-REAL et al., 2002). Esta

capacidade de medir múltiplos parâmetros celulares pela incidência da luz e, também, por fluorescência torna possível separar fisicamente subpopulações celulares (SILVA, 2003).

Figura 2 - Configuração de um citômetro de fluxo. Adaptado de Silva, et al. (2004).

Figura 3 - Representação esquemática de uma câmara de fluxo. A passagem individual das células (eventos) é conseguida por focagem hidrodinâmica do fluxo de amostra no seio de uma solução salina (*sheat fluid*). Adaptado de Silva, et al. (2004).

Uma vez que a citometria de fluxo analisa as partículas individualmente e a uma velocidade elevada, populações numerosas de células e organelas podem ser analisadas num curto espaço de tempo, e subpopulações destes citomas podem ser facilmente detectadas (DOLEZEL, 1997b).

As aplicações da citometria são numerosas e permitem a realização de pesquisas verticalizadas em diversos parâmetros celulares, como: quantidade de ácidos nucléicos, atividade enzimática, fluxo de cálcio, viabilidade celular e pH. Além disso, também é possível o uso de fluorocromos ligados a anticorpos mono e policlonais para estudar a densidade, a função e a distribuição de células e de receptores (SILVA, 2003).

No caso da integridade celular, o uso da citometria de fluxo é de grande relevância, pois é possível analisar com segurança e repetibilidade os eventos que indicam que a célula está em processo de apoptose, como análise de fragmentação de DNA, integridade da membrana celular e também despolarização da membrana mitocondrial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do ácido indol-3-acético na atividade fagocitária e na integridade celular de neutrófilos de ratos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a ação de diferentes doses de ácido indol-3-acético em características de função e integridade celular de neutrófilos, tais como:

- Capacidade de englobamento e lise intracelular de *Staphylococcus aureus*
- Alteração na atividade de mieloperoxidase
- Alteração na viabilidade celular
- Geração de fragmentação de DNA
- Geração de despolarização de membrana mitocondrial

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com pesos entre 100-150g, obtidos do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil. Quatro grupos de ratos foram estudados incluindo um grupo controle com quatro animais por grupo, e três grupos que receberam administração subcutânea de AIA. Os animais foram mantidos a 23°C, no ciclo de 12/12 horas, claro/escuro.

4.2 Preparação e administração de AIA

A solução estoque de AIA (10mg/mL) foi preparada com solução fosfato salina, pH 7,4 (PBS) e foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 5M até a completa dissolução deste ácido. O pH foi ajustado para 7,4 usando ácido clorídrico (HCl) 25% (v/v).

Os animais receberam ração *ad libitum* durante 15 dias e durante 14 dias receberam administração subcutânea de AIA. O grupo controle recebeu somente PBS e os três outros grupos receberam AIA nas doses diárias: 1mg (T1), 18mg (T2) e 40mg (T3) por Kg de massa corporal. Os animais foram pesados

semanalmente e as doses foram ajustadas de acordo com o ganho de peso. Os ratos foram manipulados todos os dias e só foram usados para este tratamento.

4.3 Células

As células foram retiradas de ratos Wistar decapitados. Os neutrófilos foram obtidos pela lavagem intraperitoneal com PBS estéril (20mL). Quatro horas antes da lavagem, foi injetado na cavidade intraperitoneal 20mL de glicogênio de ostra 0.1% (m/v) (Sigma, Tipo II) diluído em PBS, para que houvesse o recrutamento dos neutrófilos. As células foram lavadas três vezes com PBS, centrifugadas a 2.000 r.p.m (CT-5000, Cientec, Brasil) por 8 minutos. Para saber a viabilidade, as células foram contadas e classificadas no microscópio óptico (Nikon, Japão) utilizando a câmara de Neubauer e o corante azul de Trypan (1% (v/v) azul de Trypan em PBS), sendo consideradas mortas as que ficaram azuis, como ilustra a Figura 4 e Figura 5 (ABSOLOM, 1986).

Figura 4 - Avaliação da viabilidade celular dos neutrófilos em microscopia óptica (40x), utilizando azul de Trypan como corante: campo apresentando células viáveis (amarelas) e inviáveis (azuis).

Figura 5 - Avaliação da viabilidade celular dos neutrófilos em microscopia óptica (40x), utilizando azul de Trypan como corante: campo apresentando 100% de células viáveis (amarelas).

4.4 Verificação da capacidade fagocitária dos neutrófilos

4.4.1 Preparação da bactéria

Foram realizados dois ensaios. No primeiro ensaio, a cepa de *Staphylococcus aureus* (Newbould 305) foi repicada e cultivada em ágar manitol, na temperatura de 37°C e depois foi diluída e utilizada. No segundo ensaio a cepa permaneceu por um mês na temperatura de 8°C, e depois foi diluída e utilizada. O segundo ensaio foi realizado para que fosse avaliada a resposta do microrganismo, cujo metabolismo encontra-se deficiente, frente ao processo de fagocitose, sendo denominado neste trabalho de microrganismo sensibilizado.

4.4.2 Ensaio de fagocitose

A fagocitose foi avaliada pela capacidade de englobamento e lise de *S. aureus* opsonizados pelos neutrófilos de ratos, utilizando técnicas de microscopia de fluorescência para qualificar e quantificar o processo.

Para a opsonização, a cepa foi diluída em PBS para a obtenção da concentração aproximada de 3×10^9 células/mL, utilizando a escala de McFarland como parâmetro, em seguida, o microrganismo diluído foi misturado com igual volume de soro pré-aquecido a 56 °C por 30 minutos e incubados por 20 minutos

a 37°C. A cepa opsonizada foi conservada a -20°C por período máximo de 15 dias (ABSOLOM, 1986).

No ensaio da fagocitose, os neutrófilos ($\cong 2 \times 10^8$ células/mL) foram suspensos em 1 mL de PBS contendo 2% (m/v) de soro albumina livre de ácidos graxos, glicose 5mM e microrganismo opsonizado ($\cong 1,5 \times 10^9$ células/mL), e incubadas por 30 minutos a 37°C. Após este tempo as células foram deixadas por 10 minutos no gelo e depois foram preparadas para serem coradas.

4.4.3 Coloração com laranja de acridina ou “acridine orange”

A coloração com *acridine orange* (AO) permite a diferenciação entre microrganismos viáveis e não viáveis, sendo possível observar simultaneamente a atividade de englobamento e morte dos microrganismos pelas células (SMITH; ROMMEL, 1977).

O Corante foi preparado usando 1mL de AO estoque (0,1% (m/v)), juntamente com 4mL de ácido cítrico (0,1M) e 250 μ L de fosfato dissódico (0,3M).

Após o processo de fagocitose, as células foram centrifugadas a 2.000 r.p.m (CT-5000, Cientec, Brasil) por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas com 200 μ L do corante *acredine orange*. As lâminas foram preparadas com 10 μ L da solução corada e foi feita a contagem no microscópio de fluorescência (Axioplan 2, Zeiss, Alemanha). Foram contadas as bactérias vivas (verdes) e mortas (vermelhas) em 50 neutrófilos em cada lâmina.

O Cálculo da capacidade fagocitária foi feito considerando os neutrófilos que englobaram 5 ou mais partículas, indiscriminadas vivas ou mortas (verdes e vermelhas respectivamente), de 50 neutrófilos.

A lise intracelular de *Staphylococcus aureus* foi feita multiplicando número de bactérias mortas (vermelhas) englobadas por 100, divididas pelo número total de bactérias englobadas, vivas e mortas.

4.5 Verificação da integridade celular dos neutrófilos

Para analisar o efeito da administração de AIA sobre a integridade de neutrófilos foram realizados os mesmos procedimentos com os animais descritos acima, mas somente foram utilizados dois grupos tratados, T2 (18mg/Kg de massa corpórea do animal) e T3 (40mg/Kg de massa corpórea do animal) e o grupo controle como referência.

4.5.1 Integridade de membrana celular

Para este ensaio foi utilizado o citômetro de fluxo, como descrito por Nicoletti et al. (1991). Após o período de tratamento, as células foram lavadas e incubadas com iodeto de propídio (IP) ($20\mu\text{g/mL}$ em PBS) por 5 minutos em temperatura ambiente. As células fluorescentes foram avaliadas em equipamento de citometria de fluxo "FACScalibur" (Becton Dickinson Califórnia, USA) e quantificadas pelo sistema de software "Cell Quest" (Becton Dickinson CALIFÓRNIA, USA).

O iodeto de propídio não é permeável à membrana celular e possui afinidade pelo DNA, portanto, quando a célula se encontra íntegra, não há ligação entre o iodeto e o DNA, pois a substância não passa pela membrana, e a fluorescência da célula é baixa. Já quando a célula não está íntegra, o iodeto consegue se ligar ao DNA, promovendo alta fluorescência.

4.5.2 Análise da fragmentação de DNA

Para analisar a fragmentação do DNA internucleossomal, as células foram ressuspendidas e lisadas com $0,2\text{mL}$ de tampão ($0,1\%$ (m/v) de citrato de sódio e $0,1\%$ (v/v) Triton X-100) contendo $20\mu\text{g/mL}$ de IP. As células lisadas foram incubadas no escuro, em temperatura ambiente, por 2 horas. Após esse tempo, as células foram avaliadas por citometria de fluxo, como descrito anteriormente.

Este procedimento já foi utilizado por outros autores (DE MELO et al., 2004; CHAIBLE et al., 2005).

O iodeto de propídio se ligará ao DNA e se a célula estiver com o DNA íntegro, ele apresentará fluorescência alta. Já se estiver ocorrendo fragmentação ou condensação do DNA (apoptose), a fluorescência será baixa.

4.5.3 Análise da polarização da membrana mitocondrial

As células ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram ressuspensas em 1mL de PBS contendo $1\mu\text{g/mL}$ de rodamina 123 e incubadas a 37°C no escuro por 15 minutos. As células foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em 0,5mL de PBS. Após 30 minutos de incubação a 37°C no escuro, as células foram avaliadas por citometria de fluxo, como descrito anteriormente. Este procedimento já foi utilizado por outros autores (DE MELO et al., 2004).

A rodamina 123 é um corante lipofílico que entra facilmente na célula. O ambiente protonado da mitocôndria impede que o corante deixe a célula, portanto células com mitocôndrias despolarizadas (processo de apoptose), apresentarão pouca rodamina, portanto uma baixa fluorescência.

4.6 Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Amostras de células mantidas em PBS congeladas a -176°C foram descongeladas e posteriormente centrifugadas a 8.500 r.p.m (CT-1400, Cientec, Brasil) por 10 minutos. A enzima mieloperoxidase foi mensurada com base na redução da *o*-dianizidina (Sigma) na presença de peróxido de hidrogênio como descrito por Hillegass et al. (1990). Acrescentaram-se 20 μL de amostra em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 6,0 contendo H_2O_2 a 0,003% (v/v) e dicloridrato de *o*-dianizidina a 0,025% (m/v). Uma unidade internacional (UI) de atividade da enzima foi definida como a atividade de MPO necessária para promover alteração no valor de uma unidade de absorbância ocorrida em um minuto, medida em espectrofotômetro (DU-70, Beckman, USA) a 460 nm e a 25°C . A atividade da enzima foi expressa em UI por miligrama de proteína presente no extrato celular. A concentração de proteína foi determinada por espectrofotômetro, pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando soro albumina como padrão.

4.7 Análises estatísticas

A análise estatística foi feita usando ANOVA e teste de Tukey's ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média $\pm$ o desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da capacidade fagocitária dos neutrófilos utilizando *Staphylococcus aureus*

A capacidade fagocitária foi determinada pelo englobamento e lise bacteriana avaliados em microscópio de fluorescência utilizando *acridine orange* como corante. Da Figura 6 à Figura 9 encontram-se ilustradas a progressão da capacidade fagocitária avaliada em neutrófilos na presença de *Staphylococcus aureus* recém cultivados e opsonizados.

Figura 6 - Neutrófilos de ratos em microscopia de fluorescência, utilizando a coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.

Figura 7 - Início do processo de fagocitose: neutrófilo com cocos aderidos na membrana. Microscopia de fluorescência, utilizando coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.

Figura 8 - Fagocitose: Neutrófilo apresentando cocos fagocitados . Microscopia de fluorescência, utilizando a coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.

Figura 9 - Término da Fagocitose: neutrófilo com cocos fagocitados e mortos (vermelho). Microscopia de fluorescência, utilizando a coloração com *acridine orange* (1000x). Pirassununga, 2006.

A capacidade de englobamento e lise bacteriana por neutrófilos foi quantificada utilizando microscópio de fluorescência e *acridine orange* como corante após incubação destes com *Staphylococcus aureus* recém cultivados e opsonizados (Figura 10 e Figura 11). Não foram encontradas diferenças estatísticas nas características de englobamento e lise bacteriana de *Staphylococcus aureus* entre os grupos que receberam o tratamento com o ácido indol-3-acético e o grupo controle, ao nível de 5% de significância. O grupo controle apresentou uma porcentagem média de fagocitose de 48%, enquanto os tratamentos 1 (1mg/Kg de massa corpórea do animal), 2 (18mg/Kg de massa corpórea do animal) e 3 (40mg/Kg de massa corpórea do animal) apresentaram, respectivamente, 38%, 38% e 46%. Já a lise bacteriana média do grupo controle foi de 74%, enquanto os tratamentos 1, 2 e 3 foram respectivamente 78%, 73% e 72%.

Figura 10 - Efeito da administração de AIA na capacidade de englobamento de *Staphylococcus aureus*, recém cultivados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

Figura 11 - Efeito da administração de AIA na lise de *Staphylococcus aureus*, recém cultivados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

A capacidade de englobamento e de lise bacteriana foi avaliada, também, em neutrófilos após serem incubados com *Staphylococcus aureus* sensibilizados e opsonizados (Figura 12 e Figura 13). Não foi detectada diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados com ácido indol-3-acético, nas características de englobamento e lise bacteriana de *Staphylococcus aureus* sensibilizado. O grupo controle apresentou uma porcentagem média de 68%, enquanto os tratamentos 1, 2 e 3 apresentaram, respectivamente, 66%, 68% e 52%. Em relação à lise bacteriana o grupo controle apresentou uma média de 61%, enquanto os tratamentos 1, 2, e 3 foram, respectivamente, 59%, 60% e 64%.

Figura 12 - Efeito da administração de AIA na capacidade de englobamento de *Staphylococcus aureus*, sensibilizados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

Figura 13 - Efeito da administração de AIA na lise de *Staphylococcus aureus*, sensibilizados e opsonizados, avaliada em neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 1 (T1) 1mg, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

5.2 Avaliação da administração do ácido indol-3-acético sobre a integridade de neutrófilos.

A não toxicidade do ácido indol-3-acético sobre os neutrófilos foi deduzida pela determinação da integridade de membrana plasmática, integridade de DNA e capacidade de polarização de membrana mitocondrial nestas células (Figura 14 à Figura 16). O ácido indol-3-acético não se apresentou tóxico aos neutrófilos avaliados, não havendo indícios de eventos apoptóticos ou necróticos. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos que foram tratados com AIA nas avaliações de integridade de membrana plasmática, fragmentação de DNA e despolarização de membrana mitocondrial.

Na integridade de membrana plasmática o grupo controle apresentou uma média de 98% de células viáveis, já os grupos tratados 2 e 3 apresentaram médias de 97% e 96%, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 - Efeito da administração de AIA na integridade de membrana plasmática de neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

O estudo referente à integridade de DNA para o grupo controle apresentou uma média de 98% de células com DNA íntegro, enquanto que o tratamento 2 (18 mg/Kg de massa corpórea do animal) apresentou 96% e o tratamento 3 (40mg/Kg de massa corpórea do animal) apresentou 98% de integridade molecular (Figura 15).

Figura 15 - Efeito da administração de AIA na integridade de DNA de neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

Na polarização de membrana mitocondrial, o grupo controle apresentou uma média de 97% de células com membrana mitocondrial polarizável, enquanto os tratamentos 2 e 3 foram respectivamente, 97% e 98% (Figura 16).

Figura 16 - Efeito da administração de AIA na polarização de membrana mitocondrial de neutrófilos de ratos. O grupo controle (C) recebeu a administração de PBS, o tratamento 2 (T2) 18 mg e o tratamento 3 (T3) 40 mg (T3) deste ácido por kg de massa corporal diariamente.

5.3 Avaliação da enzima mieloperoxidase nos neutrófilos

A administração de ácido indol-3-acético foi estudada sobre a atividade de mieloperoxidase em neutrófilos de ratos (Tabela 1). O grupo controle apresentou uma media de $3,02 \text{ UI mg}^{-1}$ de proteína, enquanto os grupos T1, T2 e T3 apresentaram, respectivamente, 3,55, 3,30 e $4,27 \text{ UI mg}^{-1}$ de proteína, não havendo diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre eles.

Tabela 1 - Atividade de mieloperoxidase (MPO) em neutrófilos, comparando o grupo controle com os grupos tratados com 1 mg (T1), 18 mg (T2) e 40 mg (T3) de ácido indol-3-acético por Kg de massa corporal diariamente.

	Controle	Ácido Indol Acético		
		T1	T2	T3
<i>MPO</i>	3,02 ± 0,44	3,55 ± 0,48	3,30 ± 0,27	4,27 ± 0,50

Os valores apresentados se referem às medias e erro padrão do experimento. A mieloperoxidase foi expressa em UI mg⁻¹ de proteína. Seis ratos foram usados em cada tratamento.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo não foram encontradas diferenças estatísticas no processo de fagocitose (englobamento e lise bacteriana) entre os grupos tratados com ácido indol-3-acético e o grupo controle ($P < 0,05$), contrariando o estudo feito por Lins et al. (2006), onde o tratamento com AIA (2mg e 18mg de AIA por Kg de massa corporal, por dia) aumentou em até 51% a fagocitose de partículas de Zymosan.

O resultado controverso encontrado nestes dois trabalhos pode ser explicado pelo fato do Zymosan ser uma partícula inerte que não reage ao ataque do neutrófilo e o fato do *Staphylococcus aureus* ser um potente microrganismo patogênico. Quando o experimento foi realizado com o microrganismo sensibilizado, ou seja, quando este não estava com seu metabolismo em condições adequadas, podemos perceber que houve um aumento no processo de englobamento em relação ao primeiro (utilizando o microrganismo em condições normais) em todos os grupos (tratados ou não), mas não houve aumento em relação à lise, ficando a possibilidade do neutrófilo apresentar sua "cota" máxima de lise bacteriana.

Sabemos que *S. aureus* possui enzimas, toxinas e antígenos de superfície que contribuem para sua virulência. Além disso, recentes estudos têm demonstrado que a cápsula e algumas modificações nos componentes desta célula têm contribuído para a virulência deste microrganismo (SUTRA; POUTREL, 1994; KAMPEM; TOLLERSRUD; LUND, 2005; LUONG; LEE, 2002; MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

A cápsula ou pseudocápsula, composta de polissacarídeos, é um fator anti-fagocitário e recentes estudos demonstraram que a quantidade de cápsula é

decisiva para a virulência de uma cepa de *S. aureus*. A expressão na cápsula de um polissacarídeo do tipo 8 ou do tipo 5 confere à cepa de *S. aureus* uma maior resistência no processo de fagocitose por neutrófilos *in vitro* (SUTRA; POUTREL, 1994; LUONG; LEE, 2002; KAMPEM; TOLLERSRUD; LUND, 2005).

Além disso, outros fatores como toxinas alpha e beta e proteína A também contribuem para dificultar o processo de fagocitose (KAMPEM; TOLLERSRUD; LUND, 2005). Um outro fator de virulência de *S. aureus* que vem sendo muito estudado é o mecanismo de modulação da apoptose nos neutrófilos. Este programa representa o estágio final do processo de regulação transcricional da maturação dos neutrófilos e de outros múltiplos processos, incluindo apoptose (DELEO, 2004).

Outros trabalhos também relataram esta diferença no processo de fagocitose de Zymosan e microrganismos. Valle (2005), estudou a influência da vitamina E no processo de fagocitose e encontrou diferença estatística entre o grupo controle e o tratado no processo de fagocitose por partículas de Zymozan, mas não encontrou quando utilizou outros 5 microrganismos diferentes, incluindo *S. aureus*. Braga et al. (1998), estudou o *burst* oxidativo dos neutrófilos em relação à idade, através da quimiluminescência e pode perceber também uma resposta diferenciada entre a partícula de Zymosan e *Cândida albicans*.

Outro resultado encontrado foi em relação à atividade da enzima mieloperoxidase, onde não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados e o controle, completando o resultado encontrado com a capacidade de englobamento e lise bacteriana, já que se sabe que uma das técnicas mais utilizadas para análise da atividade neutrofílico é a mensuração da atividade de MPO (ODA et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999, KLEBANOFF, 2005).

Lins et al. (2006), não encontrou alteração na produção de peróxido de hidrogênio, o que também confirma o resultado encontrado neste trabalho, já que o *burst* oxidativo é uma reação em cascata, estimulada pelo invasor, que começa

com a produção de O_2^- passa pela produção de H_2O_2 e termina com a produção de potentes substâncias microbidas como o HOCL e radical hidroxil pela ação da enzima MPO.

Em relação a citotoxicidade, De Melo et al. (2004) observou um efeito tóxico do AIA em neutrófilos, com diminuição da integridade da membrana (necrose), fragmentação de DNA, condensação de cromatina e despolarização de membrana mitocondrial, o que caracterizava um processo de morte induzida pelo AIA. Este efeito foi verificado nos neutrófilos após 12 horas de cultura com AIA. O presente estudo não encontrou diferença entre os grupos tratados com AIA e o grupo controle nas características avaliadas como: integridade de membrana plasmática (necrose), fragmentação de DNA e despolarização de membrana mitocondrial que são característicos de um processo de apoptose, sendo, portanto possível uma futura aplicação de AIA em animais sem danos nestas células.

7 CONCLUSÕES

As doses testadas de ácido indol acético não promoveram um aumento na capacidade fagocitária de neutrófilos por *Staphylococcus aureus* e também não apresentaram características tóxicas nos neutrófilos avaliados.

REFERÊNCIAS

ABSOLOM, D. R. Basic Methods for the study of phagocytosis. - **Methods in Enzimology**, v.132, p.95-180, 1986.

ARENDS, M. J.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: mechanisms and role in pathology. **International Review of Experimental Pathology**, v.32, p.223-254, 1991.

BERTILSSON, L; OAALMER, L. Indole-3-acetic acid in human cerebrospinal fluid: identificaiton and quantification by mass espectrography. **Science**, v.117, p.74-76, 1972.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, P. C.; SALA, M. T.; DAL SASSO, M.; PECILE, A.; ANNONI, G.; VERGANI, C. Age-association differences in neutrophil oxidative burst (chemiluminescence). **Experimental Gerontology**, v.33, p.477-484, 1998.

CANDEIAS, L. P.; FOLKES, L. K.; DENNIS, M. F.; PATEL, K. B.; EVERETT, S. A. STRATFORD, M. R. L.; WARDMAN, P. Free radical intermediates and stable products in the oxidation of indole-3-acetic acid. **The Journal of Physical Chemistry**, v.98, p.10131-10137, 1994.

CANO, A.; ALCARAZ, O.; ARNAO, M. B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.376, p.33-37, 2003.

CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P.; MASON, R. P. The reaction of oxygen with radical from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. **Biophysical Chemistry**, v.67, p.229-237, 1997.

CELIK, I.; TULUCE, Y. Effects of indoleacetic acid and kinetin on lipid peroxidation and antioxidant defense in various tissues of rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.84, p.49-54, 2006.

CHAIBLE, L. M.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; MAIA, A. A. M.; PUGINE, S. M. P.; VALLE, C. R.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R.; DE MELO, M. P. Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.121-129, 2005.

CÔRTE-REAL, M.; SANSONETTY, F.; LUDOVICO, P.; PRUDÊNCIO, C.; RODRIGUES, F.; FORTUNA, M.; SOUSA, M.J.; TEIXEIRA DA SILVA, M.; LEÃO, C. Contributos da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Boletim de Biotecnologia**, n.71, p.19-33, 2002.

DELEO, F. R. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis**, v.9, p.399-413, 2004.

DE MELO, M. P.; LIMA, T. M.; PHITON-CURI, T. C. P.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v.148, p.103-111, 2004.

DE MELO, M. P.; PHITON-CURI, T. C. P.; CURI, R. Indole-3-acetic acid increases glutamine utilization by high peroxidase activity-presenting leucocytes. **Life Sciences**, v.75, p.1713-1725, 2004.

DE MELO, M. P.; PHITON-CURI, T. C. P.; CURI, R.; DI MASCIO, P.; CILENTO, G. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, p. 338-341, 1997.

DE MELO, M. P.; PHITON-CURI, T. C. P.; MIYASAKA, C. K.; PALANCH, A. C.; CURI, R. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophils. **General Pharmacology**, v.31, p. 573-578, 1998.

DOLEŽEL, J. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. **Journal of Applied Genetics**, v.38, n.3, p. 285-302, 1997a.

Doležel, J. Flow cytometry, its application and potential for plant breeding. **Current Topics in Plant Cytogenetics Related to Plant Improvement**, v.97, p. 80-90, 1997b.

DUKE, R. C.; WITTER, R. Z.; NASH, P. B.; YOUNG, J. D. E.; OJCIUS, D. M. Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. **The FASEB Journal**, v.8, p.237-246, 1994.

FERNANDES, P. C. C. **Manejo nutricional visando substituir a utilização de antimicrobianos em alimentos para aves**. Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos, Campinas, SP, novembro de 2003.

FERREIRA, M. S. L.; OLIVEIRA, D. L.; LINS, P. G.; PUGINE, S. M. P.; SILVA, G. S.; COSTA, E. J. X.; DE MELO, M. P. Efeito do metabolismo do triptofano sobre a capacidade fagocitária em neutrófilos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.III, p.65-70, 2004.

FOLKES, L. K.; DENNIS, M. F.; STRATFORD, M. R. I. CANDEIAS, L. P. WARDMAN, P. Peroxidase-catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membrane, DNA, and mammalian cell in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.375-382, 1999.

FOLKES, L. K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species - a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.61, p.129-136, 2001.

FULLER, R. W.; LACEFIEL, W. B.; KATTAU, R. W.; NICKANDER, R. C.; SNODDY, H.D. Myotonia produced by indoleacetic acid: studies with related compounds and correlation with drug levels in tissues. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v.193, p.48-60, 1971.

GONÇALVES, T. A levedura como modelo de apoptose: alterações bioquímicas e ciclo celular. **Revista da FML**, v.3, n.6, p.357-363, 1998.

GORDON, S. A.; BARR, S.; FRY, R. J. M. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. **American Journal of Physiology**, v.222, p.339-403, 1972.

GRECO, O; FOLKES, L. K.; WARDMAN, P.; TOZER, G. M. DACHS, G. U. Development of a novel enzyme/product combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. **Cancer Gene Therapy**, v.7, p.1414-1420, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999. 936p.

HELLEWELL, P. G.; WILLIAMS, T. J. The neutrophils. In: **Immunopharmacology of Neutrophils**. New York: Academic Press., p.1-4. 1994

HUANG, C.; LIU, L. Y.; SONG, T. S.; NI, L.; YANG, L.; HU, J. S.; SONG, L. P.; LUO, Y.; SI, L. S. Apoptosis of pancreatic cancer BXP-3 cells induced by indole-3-acetic acid in combination with horseradish peroxidase. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n.29, p.4519-4523, 2005.

JOHN, J. A.; BLOGG, C. D.; MURRAY, F. J.; SCHWETZ, B. A.; GEHRING, P.J. Teratogenic effect of the plant hormone indole-3-acetic acid in mice and rats. **Teratology**, v.19, p.321-326, 1979.

JONES, S. ; ABDALLA, D. S. P.; FREITAS, J. C. Effects of indole-3-acetic acid on croton oil-induced and arachidonic acid-induced mouse ear edema. **Inflammation Research**, v.44, p.372-375, 1995.

KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T. LUND, A. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide type 5 and 8 reduce killing by bovine neutrophils in vitro. **Infection and Immunity**, v.73, n.3, p.1578-1583, 2005.

KOGL, R.; HAGEN-SMITH, A. J.; ERXLEBEN, H. Vegetable growth substances, a phytohormones of cell extension. Purification of auxin from human urine. **The Journal of Physical Chemistry**, v.214, p.241-246, 1933.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leucocyte Biology**, v.77, n.5, p.598-625, 2005.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**, v.60, p.619-642, 1998.

LINS, P. G.; VALLE, C. R.; PUGINE, S. M. P.; OLIVEIRA, D. L.; FERREIRA, M, S. L.; COSTA, E. J. X.; DE MELO, M. P. Effect of indole acetic acid administration on the neutrophils functions and oxidative stress neutrophils, mesenteric lymph node and liver. **Life Sciences**, v.78, p.564-570, 2006.

LUONG, T. T; LEE, C. Y. Over production of type 8 capsular polysaccharide augments *Staphylococcus aureus* virulence. **Infection and Immunity**, v.70, p.3389-3395, 2002.

MARTÍNEZ, E.; ARTIGAS, F.; SUÑOL, C.; TUSSEL, J. M.; GELPÍ, E. Liquid-chromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxy-indole-3-acetic acid in human plasma. **Clinical Chemistry**, v.29, P.1354-1357, 1993.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHILINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.62-66, 2004.

MIRSKY, I. A.; DIENGOTT, D. Hypoglycemic action of indole-3-acetic acid by mouth in patients with diabetes mellitus. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.93, p. 109-110, 1956.

MILLS, M. H.; FINLAY, D. C.; HADDAD, P. R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interact chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.564, p.93-102, 1991.

ODA, T.; KATORI, M.; HATANAKA, K.; NAGAI, Y. Innibition of neutrophils migration by a selective innibitor of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. **Mediators of Inflammation**, v.4, p.133-137, 1995.

OLSSON, J.; CLAESON, K.; KARLBERG, B.; NORDSTROM, A. Determination of indole-3-acetic acid and indole-3-acetylaspasrtic acid in pea plant with capillary electrophoresis and fluorescence detection. **Journal of Chromatografy**, v.824, p.231-239, 1998.

PHITHON-CURI, T. C.; DE MELO, M. P.; DE AZEVEDO, R.; ZORN, T. M. T.; CURI, R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. **American Journal of Physiology**, v.273, p.1124-1129, 1997.

PHITHON-CURI, T. C.; DE MELO, M. P.; PALANCH, A. C.; MIYASAKA, C. K. CURI, R. Percentage of phagocytosis production of O₂⁻, H₂O₂ and NO and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. **Cell Biochemistry and Function**, v.16, p.43-49, 1998.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassay for measurement of superoxide and hydrogen peroxide by macrophages in culture, using an automatic enzyme immuno assay reader. **Journal of Immunological methods**, v.49, p.211-226, 1981.

PRINSEN, E.; CHAUVAUX, N.; SCHMIDT, J.; JHON, M.; WIENCKE, U; DEGREL, J.; SCHELL, J; VAN ONCKELEN, H. Stimulation of indole-2-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. **FEBS Letter**, v.282, p.53-55, 1991.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; RYZNAROVA, H.; FALDYNA, M. Neutrophils apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Research**, v.36, p.629-643, 2005.

SILVA, F. R. **Efeitos de benzodiazepínicos sobre a atividade de neutrófilos de ratos avaliados por citometria**. 2003. 179 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SILVA, T. L.; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J. C. Citometria de fluxo - Funcionalidade Celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia**, n.77, p.32-40, 2004.

SINNA, G.A. The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related-compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3-cells. **Comparative Biochemistry and Physiology. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.74, p.433-436, 1983.

SMITH, G. S.; LUMSDEN, J. H. Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.4, p.177-236, 1983.

SULLIVAN, W. T.; STRONG, L. M. Behavioral changes in rats and guinea pigs induced by the administration of indole-3-acetic acid and 6-aminonicotinamide. **Journal of Nutrition**, v.65, p.199-209, 1958.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.79-89, 1994.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v.267, p.1456-1461, 1995.

TERR, A. I., IMBODEN, J., PARLOW, T. G., STITES, D. P. **Medical Immunology**. 10.ed. McGraw-Hill, Medicine, 2001. 814 p.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária:uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Rocca, 2002, 532p.

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on boar sperm mobility and pregnancy and prolificacy rates after freezing and thawing. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.33-38, 1998.

TUSELL, J. M.; ARTIGAS, F.; SUNOL, C.; MARTINEZ, E.; GULP, E. Comparison of high-performance liquid-chromatography and gas-chromatography mass-spectrometry for the analysis of indole-3-acetic acid in brain-tissue. **Journal of Chromatography**, v.306, p.338-344, 1984.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.825-852, 2002.

VALLE, C. R. **Estudo da influência da suplementação de vitamina E nas atividades funcionais dos neutrófilos do leite de bovinos**. 2005. 82 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

WARDMAN, P. Indole-3-acetic acid and horseradish peroxidase: a new produg/enzyme combination for targeted cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n.15, p.1363-1374, 2002.

WEISSABACH, H.; KING, W.; SJOERDSMA, A.; UNDEFRIED, S. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissue. **Journal of Biology Chemistry**, v.234, p.81-86, 1959.

WHYTE, M. K.; MEAGHER, L. C.; MACDERMONT, J.; HASLETT, C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **Journal of Immunology**, v.150, p.5124-5134, 1993.