

AUTORES
AUTHORS

✉ **Mariana Simões Larraz FERREIRA**
Diogo Luis de OLIVEIRA
Patrícia Goldsmith LINS
Silvana Marina Piccoli PUGINE
Guilherme de Sousa SILVA
Ernane José Xavier COSTA
Mariza Pires de MELO*

Departamento de Ciências Básicas,
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo,

Av. Duque de Caxias Norte, 225, 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil,
*e-mail: mpmelo@usp.br

RESUMO

A auxina ácido indol-3-acético (AIA) pode ser encontrada nos animais devido a sua síntese a partir do triptofano, pela absorção intestinal via produção bacteriana e pela absorção intestinal via dieta rica em AIA. Em células com alta atividade de peroxidase como os neutrófilos e macrófagos o AIA atua como oxidante e naquelas em que a atividade desta enzima é baixa atua como um antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da administração de AIA sobre a funcionalidade de neutrófilos e metabolismo oxidativo em fígado de ratos. Foram utilizados ratos Wistar controles (receberam apenas tampão fosfato salina) e tratados com AIA via subcutânea e intragástrica a 1 mg (T1), 2mg (T2) e 18 mg (T3) por kg de massa corpórea por dia. Foi avaliada a capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a atividade de enzimas antioxidantes. A ação do AIA no fígado foi avaliada pela atividade da catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDh). Utilizou-se o teste de Tukey para a análise de significância estatística entre controles e os tratamentos. A administração subcutânea de AIA proporcionou aumento significativo de atividade fagocitária dos neutrófilos em 51% somente para T2 e T3. Entretanto, para a administração intragástrica T1, T2 e T3 conduziram ao aumento significativo da fagocitose em neutrófilos em 36%, 71% e 73% respectivamente. A geração de H₂O₂, atividade da catalase e da superóxido dismutase nos neutrófilos não apresentou diferença significativa sob ambas as vias de administração. Apenas a atividade da catalase apresentou diminuição significativa no fígado, para o tratamento subcutâneo sob as doses T2 e T3 (19% e 30% respectivamente) e para o tratamento intragástrico sob a dose de T3 (19%). Conclui-se que o AIA sob as diferentes vias de administração, subcutânea ou intragástrica, apresentou potencialidade para o uso em animais, visto aumentar a capacidade fagocitária dos neutrófilos e não apresentar ação oxidante tanto para os neutrófilos quanto para o fígado dos ratos.

SUMMARY

The auxin indole-3-acetic acid (IAA) can be found in animals by our tryptophan synthesis, our production by intestinal bacteria and by a diet rich in IAA. In cell with high peroxidase activity such as neutrophils and macrophages this compound leads to marked oxidant effect and in cells with low peroxidase activity this is an antioxidant. In this study was to investigate the effect of IAA in neutrophil function available by phagocytic capacity, hydrogen peroxide (H₂O₂) production and antioxidant enzymes. The IAA effect on liver was available by activities of catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDh). The Wistar rats received IAA by subcutaneous or intragastric administration in a phosphate buffer saline (the control group received only the phosphate buffer saline). The other groups received IAA at concentrations of 1 mg (T1), 2 mg (T2), and 18mg (T3) per kg of body mass per day. Comparison between control group and treatments were analyzed by Tukey's test. The treatments imposed increased the phagocytic capacity by subcutaneous (51%) for both T2 and T3, or by intragastric administration (36%, 71% e 73%) respectively, at T1, T2 and T3. However, in both source of administration the acid did not alter the H₂O₂ production, catalase and superoxide dismutase activities in neutrophils. Only catalase activity has shown a significant decrease in liver by subcutaneous from T2 and T3 (19% and 30%, respectively) and by intragastric from T3 (19%). Evidence present herein that IAA increase of phagocytic capacity and did not have a oxidant effect in neutrophil and liver. So, these effects of IAA were independent the way of administration. In conclusion, the IAA administration has a good potential animal utilization for increasing the phagocytic capacity with no oxidant effect.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

indol-3-acético; fagocitose; H₂O₂;
G6PDh; antioxidante; neutrófilo.
Indole-3-acetic; phagocytosis; H₂O₂;
G6PDh; antioxidant; neutrophil.

1. INTRODUÇÃO

O ácido indol-3-acético (AIA) é um metabólito do aminoácido triptofano produzido nas células vegetais, animais e alguns microrganismos (GORDON et al., 1972; MILLS et al., 1991). Por ser uma auxina, o AIA é largamente distribuído nos brotos, folhas jovens, flores e frutos das plantas. Alimentos ricos em triptofano como o leite e a uva quando processados na presença de microrganismos produzem compostos indólicos dentre eles o AIA. O triptofano e seus metabólitos, especialmente o AIA, são considerados potentes precursores da 2-aminoacetofenona em diferentes produtos alimentícios causando diferentes "off-flavor", sendo responsável por um atípico flavor de envelhecimento (untypical aging off-flavor, UTA) principalmente em vinhos (DOLMANN et al., 1996; CHRISTOPH et al., 1999; HOENICKE et al., 2001) e em queijos tipo Cheddar (WEIMER et al., 1997; UMMADI & WEIMER, 2001). Assim, a presença de AIA nos animais pode ser devida a três vias: a) síntese a partir do triptofano (GORDON et al., 1972); b) absorção intestinal via produção bacteriana e c) absorção intestinal via dieta rica em AIA (WEISSABACH et al., 1959; MARTINEZ et al., 1993).

O AIA em células com baixa atividade de peroxidase atua como antioxidante frente a preservação de sêmen (TONIOLLI et al., 1996) e como antiinflamatório tóxico (JONES et al., 1995). Entretanto, na presença de peroxidase este composto atua como um oxidante avaliado pelo aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (EROS) (CANDEIAS et al., 1995; CANDEIAS et al., 1997), pela sua citotoxicidade (DE MELO et al., 2004 e 1997; FOLKES & WARDMAN, 2001), indução da peroxidação lipídica e lesões em ácidos nucleicos (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/prodrug") (GRECO et al., 2000), e da proposta de aumento da atividade microbicida por neutrófilos e macrófagos em cultura (DE MELO et al., 1998).

As espécies reativas de oxigênio podem exercer papel importante nos processos oxidantes microbicidas, bem como mediadores da inflamação e da lesão tecidual. A maior parte do oxigênio consumido durante as atividades fagocitárias e secretórias dos neutrófilos e macrófagos é convertida diretamente em ânion superóxido pela NADPH-oxidase, que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio e radical hidroxil. Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) 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 fagocitados e digeridos por uma combinação de enzimas e/ou espécies reativas de oxigênio (TERR et al., 2001). Essas células possuem um eficiente sistema antioxidante enzimático para autoproteção contra as espécies reativas de oxigênio, pela ação da catalase e do ciclo da glutatona peroxidase-glutatona redutase o peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos, respectivamente, são conduzidos a compostos com baixos poderes oxidantes.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da administração de AIA sobre a funcionalidade de neutrófilos de ratos. Para tal, foram realizados experimentos

com ratos controles e tratados com AIA via subcutânea e intragástrica em três doses diferentes. Foram avaliadas a capacidade fagocitária, produção de peróxido de hidrogênio e a atividade de enzimas antioxidantes nestas células. Para avaliar o efeito do AIA no fígado foram determinadas a atividade da catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase. A glicose-6-fosfato está ligada à geração de NADPH pela via das pentoses, um co-substrato importante para a manutenção do estado redox da célula.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e tratamentos

Ratos machos Wistar (150-200 g) foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os ratos foram criados e tratados no biotério do Departamento de Ciências Básicas -ZAB da FZEA -USP em Pirassununga, SP.

Os ratos foram divididos aleatoriamente formando quatro grupos (quatro animais/grupo): 1) grupo controle (C) que recebeu 1ml de tampão fosfato salina, 10 mM e pH 7,4 (phosphate-buffered saline, PBS); 2) grupo tratado (T1) que recebeu solução de AIA em PBS (1 mg/Kg de massa corpórea); 3) grupo tratado (T2) que recebeu solução de AIA em PBS (2mg/Kg de massa corpórea) e 4) grupo tratado (T3) que recebeu solução de AIA em PBS (18mg/Kg de massa corpórea). Os animais receberam as doses de AIA, via subcutânea ou via intragástrica, diariamente durante 14 dias e no 15º dia foram sacrificados numa guilhotina. Estes procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de Ética-Animal local.

2.2 Obtenção das células

Os neutrófilos foram obtidos da cavidade intraperitoneal (ip) após 4 horas da injeção ip de glicogênio 1% em PBS, 10mM e pH 7,4. As células foram centrifugadas a 800 x g durante 10 minutos (CIENTEC, modelo CT 5000, Brasil) e ressuspendidas em PBS, 10 mM e pH 7,4. As células viáveis (> 98%) foram determinadas por exclusão em azul de tripan (0,4%) em PBS e contadas numa câmara de Neubauer usando microscópio de luz (QUIMIS, modelo Q-106-1, Brasil).

2.3 Atividade enzimática

O meio de extração da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT), consistiu de tampão fosfato de sódio (10 mM) e pH 7,5. A atividade máxima da SOD foi determinada de acordo com a taxa de redução do citocromo c pelo ânion superóxido a 25°C acompanhada espectrofotometricamente a 550nm (BEAUCHAMP & FRIDOVICH, 1971). O sistema xantina-xantina oxidase foi utilizado como fonte de ânion superóxido. A SOD da amostra competiu pelo ânion superóxido, inibindo a taxa de redução do citocromo c. O meio de ensaio foi composto pelo citocromo c (1M), xantina (50M), EDTA (100M) e tampão fosfato de sódio (50mM, pH 7,8). Neste ensaio o primeiro passo foi adequar a quantidade de xantina oxidase necessária para a redução do citocromo c em 0,03 unidades de absorbância por

minuto, 1 unidade de atividade de SOD corresponde a 50% deste valor. A atividade máxima da CAT foi avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio espectrofotometricamente a 240nm e 25°C (BECKMAN, DU-70, Alemanha). O meio de ensaio foi composto por tampão fosfato de potássio (50 mM) e peróxido de hidrogênio (10 mM).

O meio de extração da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDh) consistiu de Tris-Cl (50mM) e EDTA (1 mM) e pH 7,4 e 8,0, respectivamente. A atividade máxima da G6PDh foi determinada com base na formação de NADPH monitorado espectrofotometricamente a 340nm (BERGMAYER et al., 1974).

2.4 Produção de H₂O₂

A produção de H₂O₂ foi avaliada pelo método de vermelho de fenol (PICK & MIZEL, 1981). Este método é baseado na conversão de vermelho de fenol, pela ação de peroxidase e H₂O₂ produzido pelas células (2 x 10⁶ células/ml), em um composto colorido, que foi quantificado no espectrofotômetro a 620 nm após 45 min de ensaio.

2.5 Capacidade fagocitária

A capacidade fagocitária dos neutrófilos foi avaliada de acordo com a porcentagem de células que englobaram 3 ou mais partículas de zimozan opsonizado. As partículas de zimozan (*Sacharimycetes cerevisae*) (14mg/ml de PBS) foram opsonizadas com 1ml de soro de ratos normais (o processo levou 30 minutos a 37°C). As células (2 x 10⁶ cel/ml) em 1ml de PBS contendo (2%, v/v) soro albumina livre de ácidos graxos, em presença de glicose (5mM) e zimozan opsonizado a 37°C durante 30 minutos. O número de células que englobaram 3 ou mais partículas foi determinado numa câmara de Neubauer através de microscópio de luz, utilizando como corante solução de cristal de violeta 1% em ácido acético (SALMON et al., 1987).

2.6 Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas dos extratos de células ou de fígado foi determinado espectrofotometricamente pelo método descrito por BRADFORD (1976), usando soro albumina bovina para construção da curva padrão.

2.7 Análise dos dados

Os resultados foram expressos como a média erro padrão da média. A análise de significância estatística entre um grupo e outro foi realizada pelas médias do teste t de Student's e para a análise comparativa entre tratamentos (vários grupos) utilizou-se o teste de Tukey. Todas as determinações foram realizadas em triplicata em três experimentos diferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 encontram-se os dados referentes à capacidade fagocitária e produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos dos animais controles e dos que receberam administração subcutânea e intragástrica de AIA em três doses diferentes. A administração subcutânea de AIA proporcionou aumento significativo de atividade fagocitária dos neutrófilos em 51% para as doses de T2 e T3, análise realizada entre os controles e os tratamentos, sendo que a administração deste ácido sob a dose T1 não apresentou alteração significativa. Entretanto, todas as doses T1, T2 e T3 para a administração intragástrica conduziram ao aumento significativo da fagocitose dos neutrófilos em 36%, 71% e 73% respectivamente, análise realizada entre o controle e os tratamentos. A geração de peróxido de hidrogênio não apresentou diferença significativa entre os neutrófilos dos animais controles e dos tratados.

Durante a fagocitose de um microrganismo ou de fragmentos de tecidos, ocorrem inúmeros processos celulares incluindo diapedese, endocitose, explosão oxidativa e secreção de enzimas e compostos imunomodulatórios (UNDERHILL & OZINSKY, 2002). A combinação destes processos resulta na lise e a digestão bacteriana e/ou de partículas. Com o aumento da explosão oxidativa durante a fagocitose, inerente ao metabolismo não-mitocondrial, ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio inclusive o peróxido de hidrogênio (KARLSSON & MARKLUND, 1988; ROSEN et al., 1995). O ácido indol-3-acético aumenta a capacidade fagocitária e produção de peróxido de hidrogênio de neutrófilos em cultura (DE MELO et al., 1998). Entretanto, este aumento da geração peróxido de hidrogênio está associado a citotoxicidade e desenvolvimento do processo de morte celular denominado de apoptose em neutrófilos (DE MELO et al., 2004). No presente trabalho

Tabela 1 Efeito da administração subcutânea e intragástrica de ácido indol-3-acético (AIA) sob a capacidade fagocitária (%) e produção relativa de H₂O₂ (% relativa ao controle) em neutrófilos de ratos controles (C) e tratados com AIA nas doses de 1mg (T1), 2mg (T2) e 18mg (T3) por Kg de massa corpórea.

Tratamentos	Fagocitose (%)		Produção de H ₂ O ₂ (% relativa)	
	Subcutâneo	Intragástrico	Subcutâneo	Intragástrico
C	45,9 2,6	44,4 2,1	100	100
T1	57,8 3,2	60,5 3,3*	108,3 34,0	104,0 9,6
T2	69,2 3,9*	75,9 4,8*	113,9 47,3	93,2 15,5
T3	69,3 5,3*	76,9 4,6*	88,0 17,6	113,7 15,9

*p < 0,05 para controles em relação aos tratamentos.

Os resultados estão expressos como a média erro padrão da média para três experimentos realizados em triplicata.

observamos o aumento da capacidade fagocitária sem alteração da produção de peróxido de hidrogênio.

Apesar da fagocitose *in vivo* representar um complexo processo em que requer uma coordenada ativação de enzimas, produção de moléculas sinalizadoras e de mediadores da resposta imune (UNDERHILL et al., 2004), os resultados apresentados no presente trabalho sugere que a administração de AIA poderá aumentar a capacidade fagocitária dos neutrófilos nos animais.

Por outro lado, a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase em neutrófilos não sofreram alteração perante o tratamento com o AIA (Figura 1) em ambas as vias de administração. Estes resultados são condizentes com a inalterada produção de peróxido de hidrogênio pelas células dos animais que receberam este ácido. Conclui-se que o AIA não agiu como um oxidante para os neutrófilos.

A figura 2 apresenta os resultados obtidos da atividade de catalase e glicose-6-fosfato desidrogenase em fígados dos animais controles e dos tratados vias subcutânea e intragástrica. A atividade da enzima antioxidante catalase diminuiu significativamente em 19% e 30% nos grupos T2 e T3 em relação ao controle, respectivamente; sendo que a dose

oferecida ao grupo T1 não mostrou alteração significativa. Entretanto, o AIA administrado por via intragástrica sob a dose T3 diminuiu significativamente em 19% e nenhuma alteração foi detectada na atividade desta enzima hepática para as doses de T1 e T2, todas as análises realizadas em relação ao grupo controle. A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima chave da via das pentoses, também não foi alterada pela administração de AIA. Estes resultados nos mostram que o AIA não atua como um oxidante deduzido pela diminuição da atividade da catalase e pelo inalterado estado redox dado pela atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o AIA sob ambas as vias de administração, subcutânea ou intragástrica, apresenta potencialidade para o uso em animais, visto aumentar a capacidade fagocitária dos neutrófilos e por não apresentar ação oxidante tanto para os neutrófilos quanto para o fígado dos ratos.

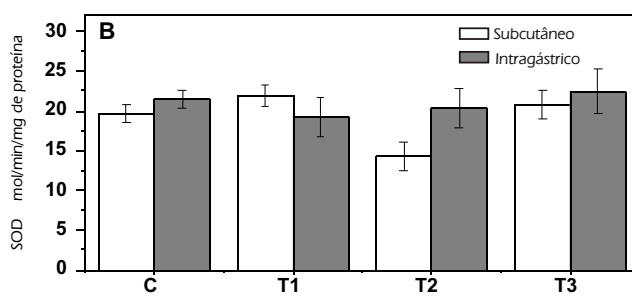
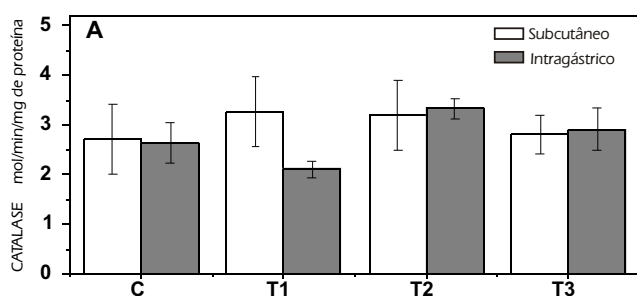


Figura 1 Atividade da catalase (CAT, 1A) e superóxido dismutase (SOD, 1B) em neutrófilos dos animais controles (C) e tratados sob as doses 1 mg (T1), 2 mg (T2) e 18 mg (T3) de AIA por Kg de massa corpórea do animal, vias subcutânea e intragástrica. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média para três experimentos realizados em triplicata. As atividades das enzimas estão em mol/min por mg de proteína.

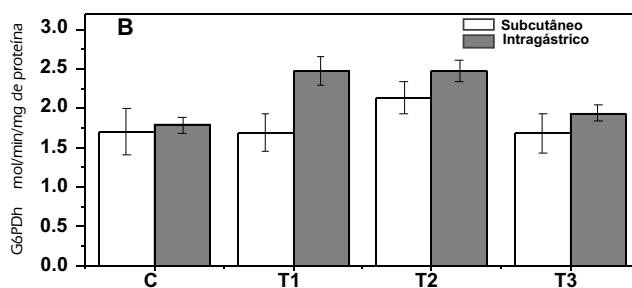
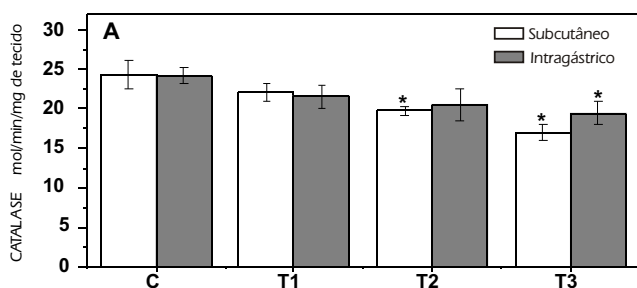


Figura 2 Efeito da administração de AIA sobre a atividade da catalase (CAT, 2A) e da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDh, 2B) em fígado de ratos controles (C) e tratados sob as doses 1 mg (T1), 2 mg (T2) e 18 mg (T3) de AIA por Kg de massa corpórea do animal, via subcutânea e intragástrica. * $p < 0,05$ em relação ao controle. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média para três experimentos realizados em triplicata. As atividades das enzimas estão em mol por g de tecido úmido.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BERGMAYER, H. U., BERNT, H., MOLLERING, E.R. Measurement of glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. London: Academic Press, 1974, p. 134-138.
- 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, n. 2, p. 248-254, 1976.
- CANDEIAS, L. P., FOLKES, L. K., PORSSA, M., PARRICK, J., WARDMAN, P. Enhancement of lipid-peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives-substituent effects. *Free Radical Research*, v. 23, n. 5, p. 403-418, 1995.
- 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, n. 1-3, p. 229-237, 1997.
- CHRISTOPH, N., GESSNER, M., SIMAT, T. J., HOENICKE, K. Off-flavor compounds in wine and other foods products formed by enzymatical, physical, and, chemical degradation of tryptophan and its metabolites. *Advances Experimental of Medicine and Biology* v.467, n. 2, p. 659-669, 1999.
- DE MELO, M. P., 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, n. 2, p. 338-341, 1997.
- DE MELO, M. P., 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, n. 4, p. 573-578, 1998.
- DE MELO, M. P., LIMA, T. M., PITHON-CURI, T. C., CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. *Toxicology Letters*, v. 148, n. 1-2, p. 103-111, 2004.
- DOLLMANN, B., WICHMANN, D., SCHMITT, A., KOHLER, H. J., SCHREIER, P. Formation of the "untypical aging off-flavour" in wine: Generation of 2-aminoacetophenone in model studies with *Saccharomyces cerevisiae*. *Viticine Enology Science*, v. 51, n. 1, p. 122-125, 1996.
- FOLKES, L. K., DENNIS, M. F., STRATFORD, M. R. L., CANDEIAS, L. P., WARDMAN, P. Peroxidase-catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA, and mammalian cells in vitro. *Biochemical Pharmacology*, v.57, n. 4, 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, n. 2, p. 129-136, 2001.
- GORDON, S. A., FRY, R. J. M., BARR, S. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. *The American Journal of Physiology*, v. 222, n. 2, p. 399-403, 1972.
- GRECO, O., FOLKES, L. K., WARDMAN, P., TOZER, G. M., DACHS, G. U. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid. *Cancer Gene Therapy*, v. 7, n.11, p. 1414-1420, 2000.
- HOENICKE, K., SIMAT, T. J., STEINHART, H., KOHLER, H. J., SCHWAB, A. Determination of free and conjugated indole-3-acetic acid, tryptophan, and tryptophan metabolites in grape must and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 5494-5501, 2001.
- JONES, L. H., 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, n. 9, p. 372-375, 1995.
- KARLSSON, K., MARKLUND, S. L. Extracellular superoxide-dismutase in the vascular system of mammals. *Biochemical Journal*, v. 255, n. 1, p. 223-228, 1988.
- 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, n. 7, p. 1354-1357, 1993.
- MILLS, M. H., FINLAY, D. C., HADDAD, P. R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography - Biomedical Applications*, v. 564, n. 1, p. 93-102, 1991.
- PICK, E., MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture. *Journal of Immunological Methods*, v. 46, n. 2, p. 211-226, 1981.
- ROSEN, G. M., POU, S., RAMOS, C. L., COHEN, M. S., BRITIGAN, B. E. Free-radicals and phagocytic-cells. *FASEB Journal*, v. 9, n. 2, p. 200-209, 1995.
- SALMON, J. E., KAPUR, S., KIMBERLY, R.P. Gamma-globulin for intravenous use induces an FC-Gamma receptor-specific decrement in phagocytosis by blood monocytes. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 43, n.3, p. 23-33, 1987.
- TERR, A. I., IMBODEN, J., PARSLAW, T. G., STITES, D. P. *Medical immunology*. 10 ed. McGraw-Hill, Medicine, 2001. 814 p.
- TONIOLLI, R., BUSSIÈRE, J., COUROT, M., COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15 degrees C of boar semen for artificial insemination. *Reproduction and Nutrition Development*, v.36, n. 5, p. 503-511, 1996.
- UMADI, M., WEIMER, B. C. Tryptophan catabolism in *Brevibacterium linens* as a potential cheese flavor adjunct. *Journal Dairy Science*, v84, n. 8, p. 1773-1782, 2001.
- UNDERHILL, D. M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Reviews in Immunology*, v. 20, n. 1, p. 825-852, 2002.
- UNDERHILL, D. M., GANTNER, B. Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and Infection*, v. 6, n. 15, p. 1368-1373, 2004.
- WEIMER, B., DIAS, B., UMMADI, M., BROADBENT, J., BRENNAND, C., JAEGI, J., JOHNSON, M. J., MILANI, F.,

STEELE, J., SISSON, D. V. Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that Cheddar cheese ripening. *Laitance* v. 77, n. 2, p. 383-398, 1997.

WEISSABACH, H., KING, W., SJOERDSMA, A., UDENFRIEND, S. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissue. *Journal of Biological Chemistry*, v. 234, n. 1, p. 81-86, 1959.

6. AGRADECIMIENTOS

Os autores agradecem ao técnico Antônio Fernandes dos Santos Jr. pelo apoio no biotério. Este trabalho foi financiado pela FAPESP e desenvolvido, em grande parte, por alunos de iniciação científica com bolsa FAPESP e PIBIC(CNPq).