



**Universidade Nova de Lisboa**

**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Resposta imunitária inflamatória de macrófagos na presença de inibidores  
de efluxo

**Autor:** Marta Isabel Martins Gabriel

**Orientador:** Prof. Doutor Miguel Viveiros Bettencourt

**Coorientadoras:** Investigadora Ana Armada e Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Biomédicas

Apoio financeiro foi realizado no âmbito do projeto de investigação científica financiado pela  
Fundação para a Ciência e a Tecnologia, com referência PTDC/BIA-MIC/121859/2010



Dedicada à minha família  
Por todo o apoio e paciência

## **Comunicações**

### **Comunicação em poster**

- Marta Gabriel, Ana Armada, Maria Pereira, Gabriela Santos-Gomes and Miguel Viveiros. Inflammatory immune response of macrophages in the presence of efflux inhibitors. Congress of Microbiology and Biotechnology 2015 (Microbiotec'15), 10 a 12 de Dezembro de 2015, Universidade de Évora

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação de mestrado contou com os importantes apoios e incentivos, sem os quais não seria possível. Desde já os meus sinceros agradecimentos

Ao meu orientador e coorientadoras, Prof. Doutor Miguel Viveiros Bettencourt, Investigadora Ana Armada e Prof. Doutora Gabriela Santos-Gomes pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência e dedicação.

À Professora Ana Tomás, do Instituto de Biologia Molecular e Celular pela disponibilidade das *L. infantum* transgênicas com expressão de uma proteína verde fluorescente.

Ao Prof. Doutor Franz Bucar do Institute of Pharmaceutical Sciences (Áustria), pela cedência do composto natural [6]-gingerol.

À Prof. Doutora Ana Pereira do ISPA Instituto Universitário e à Prof. Maria do Rosário Martins do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por toda a disponibilidade, apoio estatístico e amizade prestada.

Ao grupo de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por me terem acolhido e apoiado.

À Mariana Fernandes e à Maria Pereira, por toda a disponibilidade e apoio no trabalho com Leishmanias.

À Isabel Galucho, por todo o carinho, comentários e sugestões.

À minha família e ao Bruno Dobrões, pelo apoio, incentivo, compreensão e encorajamento durante todo o decorrer desta dissertação.

À Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT), pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

## Resumo

Os macrófagos (MØ) são as principais células efetoras do sistema imunitário, capazes de fagocitar e destruir os agentes patogênicos, desempenhando um papel crucial na defesa imunitária inata. Estas células albergam mecanismos microbicidas, tais como a acidificação dos fagolisossomas e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS). Os inibidores de efluxo (EI), tais como verapamil (VP), tioridazina (TZ), clorpromazina (CPZ), ouabaína (OUAB) podem transformar MØ com reduzida capacidade para destruir agentes patogênicos fagocitados em células microbicidas. No entanto, o papel indireto dos EI na modulação da acidificação intracelular e stress oxidativo, contribuindo para o incremento da função microbicida dos MØ, ainda não é claro. A leishmaniose é uma doença parasitária de grande impacto mundial, cujo controlo continua a ser um problema por resolver devido aos medicamentos disponíveis terem efeitos colaterais importantes. Por estes motivos, procedeu-se à procura de estratégias que promovam a redução das doses dos fármacos antileishmania, minimizando os efeitos secundários e potenciando a cura.

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito dos EI e do composto natural [6]-gingerol na resposta inflamatória dos MØ usando *Leishmania infantum* como modelo de infeção intracelular. A estimulação de MØ com lipopolissacarídeo (LPS) foi utilizada como controlo positivo de inflamação. A modulação de bombas de efluxo da linha macrofágica utilizada neste estudo pelo EI foi confirmada através do método fluorométrico semi-automático de quantificação da acumulação de EtBr em tempo real. Para além de agirem como moduladores de efluxo, VP, TZ, CPZ, OUAB e [6]-gingerol promoveram o aumento da eliminação dos parasitas, com diferentes graus de eficácia. A laranja de acridina e o *Lysotracker red* foram utilizados para avaliar por microscopia de fluorescência o efeito dos EI na acidificação intracelular de MØ infetados com *L. infantum*. Foi observado que [6]-gingerol inibiu a acidez intracelular. Pelo contrário, o VP, TZ, OUAB e CPZ promoveram a acidificação. O stress oxidativo dos MØ, nomeadamente a produção de ROS e RNS foi analisada pela através da emissão da fluorescência, usando dihidrorodamina e pela reação de Griess, respetivamente. O [6]-gingerol não induziu a produção de ROS pelas células infetadas e células estimuladas com LPS. No seu conjunto, os resultados sugerem que o [6]-gingerol é um composto antioxidante. Por outro lado, VP aumentou a produção de ROS e RNS, e CPZ conduziu ao aumento da produção de RNS sugerindo que estes compostos são indutores de stress oxidativo.

Todos os EI, mas em particular OUAB e [6]-gingerol parecem ajudar a resposta imune inata, tanto em MØ estimulados por LPS como em MØ infetados com *L. infantum*. Em estudos futuros, a associação de EI com fármacos antileishmania pode vir a ser vantajosa para aumentar a eficiência da terapêutica.

**Palavras-chave:** Macrófagos, Inibidores de efluxo, Lipopolissacarídeo, *Leishmania infantum*

## Abstract

Macrophages (MØ) are major effector cells able to phagocyte and destroy pathogens, playing a crucial role in innate immune defense. These cells harbor microbicide mechanisms such as the acidification of phagolysosomes and the production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS). Efflux inhibitors (EI) such as verapamil (VP), thioridazine (TZ), chlorpromazine (CPZ), ouabain (OUAB) can transform MO with a reduced ability to destroy phagocytosed pathogens in microbicides cells. However, the indirect role of EI in the modulation of intracellular acidification and oxidative stress, contributing to increase the MØ microbicidal function, are still unclear. Leishmaniasis is a parasitic disease of major global impact whose control remains an unsolved problem due to few available drugs with important side effects.

Therefore, we started looking for a strategy that could promote the reduction of doses of *Leishmania* drugs, minimizing side effects and maximizing the cure.

This study aims to evaluate the effect of EI and the natural compound [6]-gingerol in the MØ inflammatory response using the intracellular *Leishmania infantum* model. Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated MØ were used as an inflammation positive control. MØ modulation of efflux pumps used in this study by the EI was confirmed through a semi-automated fluorometric method by quantifying the accumulation of EtBr in real time. Besides acting as efflux modulators, the VP, TZ, CPZ, OUAB and [6]-gingerol lead an increasing elimination of parasites, with different types of efficiency. Acridine orange and Lysotracker red were used to evaluate through fluorescence microscopy the EI effect in the intracellular acidification of *L. infantum*-infected MØ. It was observed that [6]-gingerol inhibited intracellular acidification. VP, TZ, OUAB and CPZ increased acidification. MØ oxidative stress, namely the production of ROS and RNS was analyzed by fluorescence, using dihydrorodamine and by Griess assay, respectively. [6]-gingerol not inducing the production of ROS in infected and LPS-stimulated cells. In overall the results suggest that [6]-gingerol is an antioxidant compound. On the other hand, VP enhanced production of ROS and RNS, and CPZ has led to increased RNS production, suggesting these compounds are inducers of oxidative stress.

All EI, but in particular OUAB and [6]-gingerol seems to help innate immune response in both LPS-stimulated MØ and *L. infantum*-infected MØ. Future EI association studies with antileishmanial drugs may be advantageous for increasing therapeutic efficiency.

**Key-words:** Macrophages, efflux inhibitors, lipopolysaccharide, *Leishmania infantum*

## Índice

Comunicações .....	i
Agradecimentos .....	ii
Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Lista de abreviaturas .....	xi
I. Introdução .....	13
1. Sistema imunitário.....	13
1.1. Resposta imunitária inata.....	13
1.2. Vias de sinalização da fagocitose .....	14
1.2.1. Recetores do tipo Toll.....	15
1.2.2. Recetores do tipo NOD.....	16
1.3. Resposta inflamatória .....	17
1.4. Stress oxidativo .....	17
1.4.1. Espécies reativas de oxigénio .....	19
1.4.2. Espécies reativas de azoto .....	19
1.5. Acidificação intracelular.....	19
2. Leishmaniose.....	20
2.1. Morfologia e ciclo de vida.....	20
2.2. Mecanismos de resistência ao sistema imunitário.....	21
2.3. Mecanismos de resistência a fármacos .....	21
2.3.1. Inibidores de efluxo .....	22
Objetivos.....	23
II. Materiais e Métodos .....	24
1. Material biológico .....	24
1.1. Macrófagos RAW 264.7.....	24
1.2. <i>Leishmania infantum</i> .....	24
2. Modelos de resposta inflamatória.....	25
2.1. Estimulação de macrófagos RAW 264.7 com LPS.....	25

2.2	Infeção de macrófagos RAW 264.7 com <i>L. infantum</i> .....	25
3.	Avaliação do efeito modulador de compostos na atividade das bombas de efluxo de macrófagos.....	26
4.	Avaliação do modelo de infeção <i>L. infantum</i> em macrófagos RAW 264.7 .....	27
4.1	Avaliação da viabilidade de <i>L. infantum</i> após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo.....	27
4.2	Avaliação da capacidade multiplicativa de <i>L. infantum</i> após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo.....	28
5.	Avaliação do efeito dos inibidores de efluxo na acidificação dos fagossomas/lisossomas .....	29
5.1	Avaliação da citotoxicidade dos inibidores de efluxo em células RAW 264.7 .....	29
5.2	Determinação da viabilidade celular em ensaios de fluorescência.....	30
5.3	Avaliação do pH intracelular .....	31
5.3.1	Deteção da acidificação intracelular utilizando laranja de acridina.....	32
5.3.2	Identificação de vesículas acídicas utilizando <i>Lysotracker red</i> .....	32
6.	Avaliação da atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo.....	33
6.1	Produção de radicais livres de oxigénio.....	33
6.2	Deteção de óxido nítrico.....	34
III.	Resultados e Discussão.....	35
1.	Efeito dos inibidores de efluxo na viabilidade celular .....	35
1.1	Citotoxicidade dos inibidores de efluxo em RAW 264.7.....	35
1.2	Viabilidade celular .....	36
2.	Atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo em macrófagos RAW 264.7 .....	36
3.	Infeção de macrófagos RAW 264.7 por <i>L. infantum</i> .....	38
3.1	Viabilidade de <i>L. infantum</i> após o isolamento a partir de macrófagos tratados com inibidores de efluxo.....	38
3.2	Capacidade multiplicativa de <i>L. infantum</i> após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo .....	40
4.	pH intracelular.....	43
4.1	Modelação da acidificação intracelular pelos inibidores de efluxo.....	43
4.2	Identificação de vesículas acídicas .....	45

5.	Atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo .....	46
5.1	Produção de radicais livres de oxigénio em macrófagos.....	46
5.2	Produção de óxido nítrico.....	48
6.	Conclusões .....	50
7.	Referências.....	54

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Processo de fagocitose de microrganismos. Adaptado de (Owen <i>et al.</i> , 2009). .....	14
<b>Figura 2:</b> Recetores do tipo Toll e respetivos ligantes. dsRNA simboliza RNA viral de cadeia dupla (do inglês <i>double – stranded RNA</i> ), ssRNA significa RNA viral de cadeia simples (do inglês <i>single-stranded RNA</i> ) e CpG DNA exprime os locais onde o DNA contem regiões de citosina e guanina separadas por apenas um fosfato. Adaptado de (Takeda & Akira, 2003)......	15
<b>Figura 3:</b> Via de transcrição de COX-2. Adaptado de (Di Mari <i>et al.</i> , 2007).....	18
<b>Figura 4:</b> Esquemática do ensaio da capacidade multiplicativa de <i>L. infantum</i> após isolamento do parasita a partir de macrófagos tratados com inibidores de efluxo. A cor verde é representativa dos ensaios com macrófagos infetados tratados durante 24 h com EI. A cor azul é representativa dos ensaios com macrófagos infetados tratados durante 48 h com EI. E a cor roxa é representativa dos ensaios decorridos com macrófagos infetados tratados durante 72 h com EI. ....	29
<b>Figura 5:</b> Macrófagos infetados com <i>L. infantum</i> após incubação durante 24 h com VP com emissão de fluorescência verde de Calceina AM. ....	36
<b>Figura 6:</b> Acumulação de EtBr em macrófagos tratados com EI. Na figura encontram-se representados unicamente os EI e as respetivas concentrações que apresentaram unidades arbitrárias de fluorescência (UFa) superiores ao valor indicativo de cut-off (VIC)......	38
<b>Figura 7:</b> Viabilidade de <i>L. infantum</i> isolados de macrófagos tratados com inibidores de efluxo durante 24 h, 48 h e 72 h, ao 7º dia de incubação com meio de Schneider. As 0 h de incubação são representativas da viabilidade de <i>L. infantum</i> isolados de macrófagos não tratados com inibidores de efluxo. Os resultados são expressos pela média de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição. * ( $P < 0,05$ ) indica diferenças significativas quando se compararam parasitas isolados de células tratadas com parasitas isolados de células não tratadas.....	39
<b>Figura 8:</b> Esquemática temporal do ensaio da capacidade multiplicativa de <i>L. infantum</i> após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo (A). Viabilidade de <i>L. infantum</i> isolada de macrófagos tratados com inibidores de efluxo durante 24 h, 48 h e 72 h, ao 7º dia de incubação com meio Schneider. As 0 h de incubação são representativas da viabilidade de <i>L. infantum</i> isolados de macrófagos não tratados com inibidores de efluxo, ao 7º dia de incubação com meio Schneider (B).	

Acompanhamento, ao longo de três dias, da capacidade multiplicativa de promastigotas de *L. infantum* isolados de macrófagos RAW 264.7 que foram tratados com EI durante 24 h (C), 48 h (D) e 72 h (E). Os resultados são expressos pela média de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição. .... 42

**Figura 9:** Macrófagos infectados com *L. infantum* após incubação durante 4h (A) e 24 h (B) com VP com emissão de fluorescência verde (2) e vermelha (3) de AO. Nas imagens 1 é possível observar a sobreposição das imagens B e C (Amplificação 1000x)..... 43

**Figura 10:** Macrófagos infectados por *L. infantum* incubados durante 4h (A) e 24 h (B) com VP emitem fluorescência vermelha quando incubados com LTR (Ampliação 400x). .... 45

**Figura 11:** Macrófagos estimulados com LPS após 4 h de incubação com VP emitem fluorescência de verde quando incubadas com DHR (A). Macrófagos estimulados com LPS após 4 h de incubação sem EI não emitem fluorescência de verde quando incubadas com DHR (B) (Amplificação 400x). .... 47

**Figura 12:** Detecção de nitritos produzidos por macrófagos não infectados, estimulados com LPS e infectados com *L. infantum* na presença de EI durante 24 h. .... 49

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Concentrações de inibidores de efluxo utilizados nos ensaios acumulação de EtBr em macrófagos RAW 264.7.....	27
<b>Tabela 2:</b> Concentrações máximas e mínimas dos inibidores de efluxo para a determinação da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7. ....	30
<b>Tabela 3:</b> Concentrações de inibidores de efluxo de IC10 em macrófagos RAW 264.7. ....	31
<b>Tabela 4:</b> Índice citotóxico para 50% (IC50) e 90% (IC10) dos inibidores de efluxo em macrófagos RAW 264.7. ....	35
<b>Tabela 5:</b> Acumulação de EtBr em macrófagos tratados com EI. As unidades arbitrárias de fluorescência (UFa) superiores ao valor indicativo de cut-off (VIC) estão indicados a preto e os valores inferiores ao VIC estão indicados a cinzento. ....	37
<b>Tabela 6:</b> Emissão de fluorescência de AO em células não infetadas, estimuladas com LPS e em células infetadas com <i>L. infantum</i> na presença de EI, durante 4 h e 24 h.....	44
<b>Tabela 7:</b> Emissão de fluorescência de LTR em células não infetadas, estimuladas com LPS e em células infetadas com <i>L. infantum</i> na presença de EI, durante 4 h e 24 h.....	46
<b>Tabela 8:</b> Emissão de fluorescência de DHR em células não infetadas, estimuladas com LPS e em células infetadas com <i>L. infantum</i> na presença de EI, durante 4 h. ....	48

## Lista de abreviaturas

**ABC** – Transportador de cassete de ligação ATP, do inglês *ATP-binding cassette transporter*

**AO** - Laranja de acridina, do inglês *Acridine Orange*

**ATP** - Adenosina trifosfato, do inglês *adenosine triphosphate*

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**COX-2** - Ciclo-oxidase 2, do inglês *cyclooxygenase-2*

**CPZ** - Clorpromazina

**DHR** - Dihidrorodamina 123

**DMEM** - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**EtBr** – Brometo de etídio, do inglês *ethidium bromide*

**FBS** – Soro fetal bovino, do inglês *Fetal Bovine Serum*

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de Hidrogênio

**HEPES** – Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanossulfônico)

**IC** – Índice de citotoxicidade

**IL-1 $\beta$**  - Interleucina-1 beta

**iNOS** - Óxido nítrico sintase induzida, do inglês *inducible nitric oxide synthase*

**LC**- Leishmaniose cutânea

**LPG** – Lipofosfoglicano, do inglês *lypophosfoglican*

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**LRR** – Repetições ricas em leucina, do inglês *Leucine-rich repeats*

**LTR** – do inglês *LysoTracker red*

**LV**- Leishmaniose visceral

**MDR** - Resistência a múltiplos fármacos, do inglês *Multidrug resistance*

**M $\emptyset$**  – Macrófago

**MTT** - 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazóleo brometo (Azul de tetrazólio)

**MyD88** - Fator de diferenciação mieloide 88, do inglês *Myeloid differentiation factor 88*

**NF- $\kappa$ B** - Factor nuclear kappa B, do inglês *nuclear factor kappa B*

**NLR** - Recetores do tipo de domínio de oligomerização a nucleótidos, do inglês *nucleotide oligomerization domain like receptor*

**NLRP1** - Proteína 1 do domínio pyrin de NLR, do inglês *nucleotide oligomerization domain like receptor with pyrin domain containing 1*)

**NO** - Óxido nítrico, do inglês *nitric oxid*

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ião superóxido

**OUAB** – Ouabaína

**p38 MAPK** - proteína 38 quinases ativada por mitogénio, do inglês *p38 mitogen-activated protein kinases*

**PAMPs** - Padrões moleculares associados a agentes patogénicos, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*

**PBS** - Tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

**Pgp** - Glicoproteínas-P, do inglês *P-glycoprotein*

**PRRs** - Recetores de reconhecimento padrão, do inglês *pattern recognition receptors*

**RNS** - Espécies reativas de azoto, do inglês *reactive nitrogen species*

**ROS** - Espécies reativas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

**RPMI** - do inglês *Roswell Park Memorial Institute culture médium*

**SCH** - Meio de Schneider

**TIR** - Domínio homólogo do recetor Toll/interleucina-1, do inglês *Toll/interleukin-1 receptor*

**TLR** – Recetores Toll-like, do inglês *Toll-like receptor*

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

**TRIF** - Fator de indução IFN- $\beta$  do domínio TIR, do inglês *TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  factor*)

**TZ** - Tioridazina

**UFa** - Unidades arbitrárias de fluorescência

**VIC** - Valor indicativo de cut-off

**VP** - Verapamil

## **I. Introdução**

### **1. Sistema imunitário**

As células representam a unidade estrutural e funcional dos seres vivos. Ao longo do seu ciclo de vida atuam como transmissores e recetores de inúmeros sinais químicos e físicos. As células podem sofrer alterações fisiológicas e morfológicas provocadas por estímulos exteriores, como é o caso de infeções por agentes patogénicos. Estas alterações são desencadeadas pelo sistema imunitário em vertebrados (Reybier *et al.*, 2010).

O sistema imunitário é dividido em duas vertentes, a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata consiste na primeira linha de resposta, rápida e não específica, contra infeções por agentes patogénicos. Já a imunidade adaptativa surge como resposta específica após alguns dias de exposição a antigénios considerados estranhos pelo sistema imune. O sistema imune inato inclui barreiras físicas e químicas. As barreiras físicas são as camadas epiteliais da pele e da mucosa, capazes de bloquear a entrada de agentes patogénicos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas. As barreiras químicas são substâncias solúveis, como proteínas e recetores membranares. Os agentes patogénicos que conseguem ultrapassar estas barreiras são capazes de sobreviver no espaço extracelular, infetar células, replicar-se e espalhar-se por outras partes do corpo (Owen *et al.*, 2009).

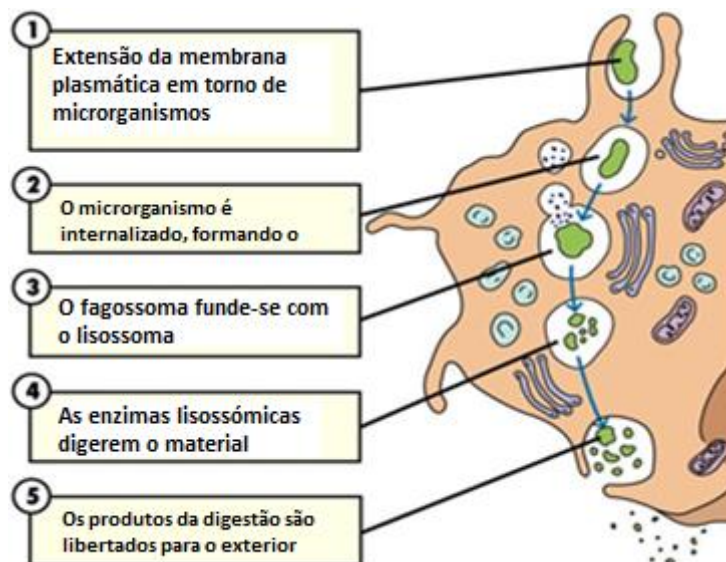
#### **1.1. Resposta imunitária inata**

O sistema imunitário inato inclui uma resposta celular altamente eficaz e capaz de fagocitar agentes patogénicos entre outros elementos considerados estranhos ao sistema como grãos de poeira, pólen, esporos, etc. Os macrófagos (MØ) são células do sistema imune inato que através de recetores de membrana conseguem reconhecer componentes moleculares conservados dos agentes patogénicos, chamados de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Os recetores que reconhecem PAMP são denominados de recetores de reconhecimento padrão (do inglês *pattern recognition receptors*, PRR) (Kawai & Akira, 2010).

O reconhecimento dos PRR através de PAMP ativa a fagocitose nos MØ, através de vias de sinalização. Outros recetores podem induzir a produção de proteínas e outras substâncias que orientam o recrutamento de células e moléculas para o local da infeção. Este acontecimento provoca mudanças fisiológicas, como o inchaço local (edema) e vermelhidão (rubor), sendo denominado de inflamação. A resposta inflamatória mediada pela imunidade inata é benéfica para a eliminação de agentes patogénicos (Palm & Medzhitov, 2009).

### 1.2. Vias de sinalização da fagocitose

As vias de sinalização da fagocitose incitam à extensão de membrana plasmática em torno de partículas e/ou microrganismos, como se encontra esquematizado na **Figura 1**. Este acontecimento leva à formação do fagossoma, desencadeado pela polimerização de actina. Quando o fagossoma se funde com o lisossoma ocorre a formação de fagolisossoma. Os fagolisossomas apresentam pH ácido e são constituídos por agentes antimicrobianos como proteínas, péptidos, enzimas hidrolíticas, e moléculas que desencadeiam o ataque oxidativo (Areschoug & Gordon, 2009).



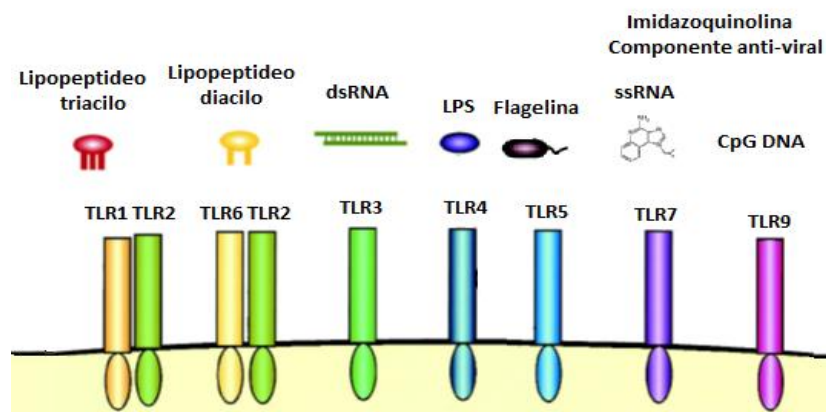
**Figura 1:** Processo de fagocitose de microrganismos. Adaptado de (Owen *et al.*, 2009).

### 1.2.1. Recetores do tipo Toll

Os recetores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptor*) são recetores da família dos PRR. O nome “Toll” deriva da gíria alemã que significa “estranho”, tendo sido descoberto em embriões da mosca da fruta com uma mutação no gene que altera a conformação do eixo dorso-ventral (Patni *et al.*, 2007; Owen *et al.*, 2009).

Existem 13 TLR conhecidos, TLR 1-10 são recetores humanos e de murganhos, e TLR 11-13 são exclusivos de murganhos. Na **Figura 2** é possível observar esquematicamente os ligandos de alguns dos TLR. Os TLR são constituídos por três regiões: uma região extracelular com repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *Leucine-rich repeats*), uma região transmembranar muito curta e uma região citoplasmática denominada por domínio homólogo do recetor Toll/interleucina-1 (TIR, do inglês *Toll/interleukin-1 receptor*) (Doyle & O’Neill, 2006).

O TIR interage com outros membros de domínios de TLR por via de transdução de sinal. A ligação do TLR ao ligando específico promove a ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B, do inglês *nuclear factor kappa B*), o qual está envolvido na regulação da produção de enzimas, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Os indutores de NF- $\kappa$ B são muito variáveis e incluem espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor*, TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e lipopolissacarídeo (LPS) (Qin *et al.*, 2005). Quando os TLR interagem com PAMP através de LRR, os TLR são induzidos a dimerizar, formando um homodímero. Contudo, existem TLR que emparelham entre si, como é o caso de TLR1 e TLR 6 (Patni *et al.*, 2007).



**Figura 2:** Recetores do tipo Toll e respetivos ligantes. dsRNA simboliza RNA viral de cadeia dupla (do inglês *double – stranded RNA*), ssRNA significa RNA viral de cadeia simples (do inglês *single-stranded RNA*) e CpG DNA exprime os locais onde o DNA contém regiões de citosina e guanina separadas por apenas um fosfato. Adaptado de (Takeda & Akira, 2003).

O domínio TIR serve de ligação a adaptadores que ativam vias de sinalização. Os adaptadores que ativam vias de sinalização são MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88, do inglês *Myeloid differentiation factor 88*) e o TRIF (fator de indução IFN- $\beta$  do domínio TIR, do inglês *TIR-domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  factor*) (Fukata, Vamadevan & Abreu, 2009). A maioria dos TLR localizados na superfície das células e dos lisossomas/endossomas liga-se a MyD88. Contudo, TLR4 é o único que se liga a MyD88 quando está na membrana plasmática, sinalizando a endocitose e a TRIF quando está nos endossomas após a internalização.

### 1.2.2. Recetores do tipo NOD

Os recetores do tipo NODLR (do inglês *nucleotide oligomerization domain like receptor*, comumente designados apenas por NLR) são recetores citoplasmáticos da família dos PRR. Os NLR cooperam com recetores do tipo Toll na regulação da resposta inflamatória e apoptótica (Gurung & Kanneganti, 2015). Existem cerca de 22 NLR em seres humanos e 34 NLR em murganhos, divididos em diferentes grupos com base nos domínios de ativação de N-terminal envolvidos na transdução de sinal (Wells *et al.*, 2011). Os NLR são constituídos por 3 domínios: o centro de ligação ao nucleótido *Nacht*, c-terminal com repetições ricas em leucina (LRR) e um domínio de interação variável N-terminal (Franchi *et al.*, 2009).

Um subconjunto NLR denominado por NLRP1 (proteína 1 do domínio *pyrin* de NLR, do inglês *nucleotide oligomerization domain like receptor with pyrin domain containing 1*) é capaz de oligomerizar com uma estrutura ativadora da cascata da caspase 1 e conduzir à produção de citocinas pró-inflamatórias. Esta oligomerização é denominada por inflamassoma, do inglês *inflammasome* (Martinon, Burns & Tschopp, 2002). Os inflamassomas são centrais de clivagem e de ativação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Gurung & Kanneganti, 2015). A IL-1 $\beta$  é capaz de induzir a produção de óxido nítrico e promover a morte de *Leishmania* em M $\emptyset$  (Lima-Junior *et al.*, 2013).

### 1.3. Resposta inflamatória

A resposta inflamatória é uma reação fisiológica desencadeada por uma infecção ou trauma/lesão (Chou *et al.*, 2013). Em consequência de uma infecção os MØ são ativados, libertando mediadores inflamatórios, libertando citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , provocando *stress* oxidativo (Kassim *et al.*, 2012).

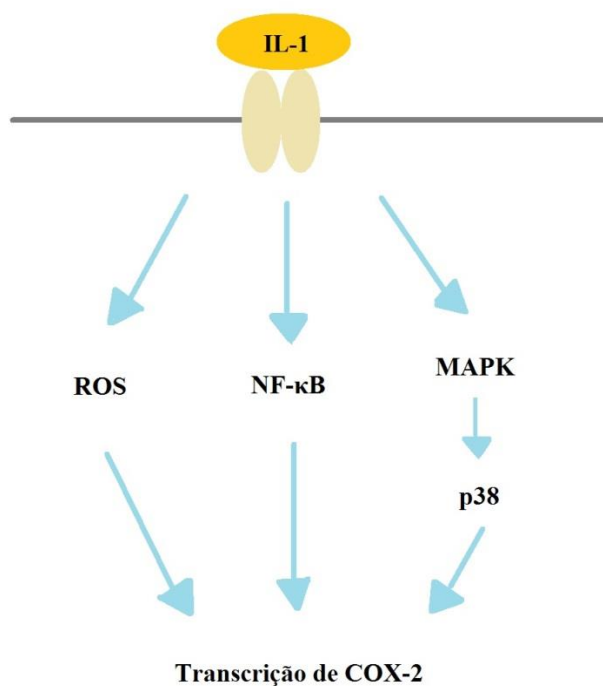
Para serem benéficas as respostas inflamatórias devem ser cuidadosamente reguladas. Contudo, alguns distúrbios podem gerar uma resposta inflamatória prejudicial devido à superprodução de vários mediadores. Nestes casos, a sépsis é o acontecimento mais perigoso que daí pode advir. A sépsis consiste numa resposta generalizada à infecção com sinais e sintomas sistémicos que inclui febre alta, tensão arterial baixa, função dos principais órgãos comprometida, batimento cardíaco e frequência respiratória elevados (Kassim *et al.*, 2014). A sépsis causa todos os anos milhões de mortes e continua a ser a maior causa de morte hospitalar (Deutschman & Tracey, 2014). A resposta inflamatória sistémica desencadeada por septicemia é responsável por níveis circulantes elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (interleucina-6), responsáveis por uma elevada morbidade.

A maior causa de septicemia por bactérias gram-negativas é a molécula lipopolissacarídeo (LPS), componente da membrana externa das bactérias gram-negativas. O LPS é um ligando de TLR4, um mediador de imunidade inata que estimula os MØ ou monócitos a produzir citocinas pró-inflamatórias. A exposição contínua dos MØ ao LPS bloqueia a resposta deste estímulo, sendo designado por tolerância imunológica ao LPS. A tolerância ao LPS possibilita a exposição contínua do LPS sem provocar choque séptico (Tucsek *et al.*, 2011).

### 1.4. Stress oxidativo

O stress oxidativo é causado pela acumulação de espécies reativas de oxigénio (do inglês *reactive oxygen species*, ROS) e espécies reativas de azoto (do inglês *reactive nitrogen species*, RNS). Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais eletrões desemparelhados, são altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula. Podem ser formados no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas (Anderson, 1996; Yu & Anderson, 1997). A associação de ROS com RNS é altamente

tóxica para microrganismos fagocitados devido à alteração molecular microbiana através da oxidação, hidroxilação e produção de nitritos. Todavia, quando presentes em grandes concentrações têm consequências para a saúde. A ocorrência de stress oxidativo moderado está associada ao aumento de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes atuam como reguladores da produção de ROS e RNS (Bianchi & Antunes, 1999). O [6]-gingerol é um composto bioativo encontrado no gengibre (*Zingiber officinale*) muito utilizado na medicina oriental tradicional com capacidade antioxidante, anti-inflamatória e anti-tumoral (Aeschbach *et al.*, 1994). Este composto está relacionado com a regulação de citocinas pro-inflamatórias e tem demonstrado inibir a expressão de COX-2 (ciclo-oxidase 2, do inglês *cyclooxygenase-2*) por ativação de p38 MAPK (do inglês *p38 mitogen-activated protein kinases*) e NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). A expressão de COX-2 está representada esquematicamente na **Figura 3**.



**Figura 3:** Via de transcrição de COX-2. Adaptado de (Di Mari *et al.*, 2007)

#### **1.4.1. Espécies reativas de oxigênio**

As ROS são concebidas através do complexo enzimático NADPH-oxidase dos MØ ativos após ligação com microrganismos (Lee *et al.*, 2012). O oxigênio consumido é fornecido pelo processo de explosão respiratória (do inglês *respiratory burst*), no qual a absorção de oxigênio aumenta. O NADPH-oxidase converte o oxigênio em ião superóxido ( $O_2^-$ ), que, por sua vez, é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), através da enzima superóxido dismutase (Nathan & Ding, 2010).

#### **1.4.2. Espécies reativas de azoto**

As RNS são produzidas após ativação da transcrição do gene para a enzima sintase indutível do óxido nítrico (do inglês *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) (Kassim *et al.*, 2012). Ao oxidar L-arginina, iNOS gera L-citrulina e óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*, NO). O óxido nítrico é um agente antimicrobiano de curta duração, com elevada capacidade de indução de morte celular (Joo *et al.*, 2014).

#### **1.5. Acidificação intracelular**

A acidificação dos fagolisossomas é caracterizada por um pH de 4 a 4,5 e elevada atividade das hidrolases. Os materiais não degradados são removidos das células por exocitose. A acidificação intracelular é um mecanismo que promove a destruição de inúmeros agentes patogênicos através da ativação das enzimas hidrolíticas (Schaible, 2015). O pH intracelular pode também afetar a atividade de determinados fármacos. Logo, um microrganismo capaz de influenciar o pH no fagolisossoma tem vantagens para a sua sobrevivência (Eissenberg, Goldman & Schlesinger, 1993).

## 2. Leishmaniose

A leishmaniose é uma infecção parasitária de mamíferos provocada por parasitas do género *Leishmania* transmitidos por flebotomídeos (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Kaye & Scott, 2011). Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose humana. Dependendo da espécie do parasita e da resposta imune do hospedeiro mamífero, subsistem vários tipos de manifestações clínicas, como é o caso da leishmaniose visceral (LV) e cutânea (LC) (Singh *et al.*, 2012). A LV é provocada por infecção por *Leishmania infantum* ou *Leishmania donovani*. Após a infecção, o parasita replica-se no baço, fígado e em nódulos linfáticos, sendo esta a forma clínica mais grave e letal (World Health Organization, 2010). Todavia, no caso de infeções por *L. infantum* indivíduos adultos imunocompetentes são na sua maioria assintomáticos, sendo o sistema imunitário capaz de combater o parasita (Sahni, 2012).

A leishmaniose integra o conjunto de doenças tropicais negligenciadas, cujo interesse da comunidade científica tem vindo a aumentar nos últimos anos, sendo benéfico para o estudo do combate a esta doença (Al-Mutawakel *et al.*, 2010).

### 2.1. Morfologia e ciclo de vida

O protozoário *Leishmania* é um parasita dimórfico, com uma fase de desenvolvimento intracelular no hospedeiro mamífero, designada por amastigota e uma fase de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado extracelular, designada promastigota (Gurung & Kanneganti, 2015).

Quando um flebotomídeo fêmea realiza uma refeição sanguínea num vertebrado infetado com *Leishmania* inicia-se um novo ciclo de vida. No intestino médio do vetor, o parasita altera a sua morfologia para promastigota migrando para a probóscide. O promastigota caracteriza-se por ter um corpo esguio com cerca de 15 a 20 µm de comprimento por 1,5 a 3,5 µm de largura, com um flagelo anterior com 15 a 29 µm. A fase promastigota distingue-se por duas etapas de desenvolvimento, a etapa procíclico não infeccioso onde ocorre replicação parasitária intensa e a etapa metacíclico extremamente infeccioso (Killick-Kendrick, 1999). No momento da alimentação sanguínea, o vetor infetado transmite o parasita na forma promastigota metacíclica através da probóscide. Já no hospedeiro vertebrado, os parasitas são fagocitados e transformam-se em amastigotas. Os

amastigotas são uma fase de desenvolvimento intracelular obrigatória não flagelada, apresentam forma esférica ou ovoide com 2,5 a 5 µm de diâmetro. Alojaram-se no vacúolo parasitóforo que de imediato se funde com lisossomas. Os parasitas replicam-se por fissão binária no interior dos fagolisossomas. Quando o número de parasitas é elevado, a sua atividade gera lise celular, sendo que os amastigotas livres são novamente fagocitados ou ingeridos por flebotomíneos durante uma nova alimentação sanguínea (Bogdan & Röllinghoff, 1998).

## 2.2. Mecanismos de resistência ao sistema imunitário

O parasita *Leishmania* demonstra possuir diversas estratégias para evitar a sua destruição no hospedeiro mamífero.

Uma destas estratégias coincide com a capacidade de resistência à degradação pelo fagolisossoma. O parasita contém proteínas de superfície, como é o caso de lipofosfoglicano (LPG) que o auxilia no ambiente hostil do fagolisossoma (Gurung & Kanneganti, 2015). Possui a capacidade de alterar e eliminar a produção de radicais livre de oxigénio e azoto através da sua atividade enzimática (Bogdan & Röllinghoff, 1998). Este parasita tem ainda a capacidade de inativar a atividade enzimática lisossomal e alterar o pH para níveis favoráveis à sua sobrevivência dentro do fagolisossoma (Bogdan & Röllinghoff, 1998; Bogdan, Rollinghoff & Solbach, 1990; Guedes *et al.*, 2015).

## 2.3. Mecanismos de resistência a fármacos

O parasita apresenta inúmeras estratégias de resistência a diversos fármacos. A elevada atividade de efluxo é um dos principais mecanismos de resistência da *Leishmania* (Ouellette, Légaré & Papadopoulou, 2001).

Os transportadores ABC (do inglês *Adenosine Triphosphate Binding Cassete*) são proteínas transmembranares que utilizam a energia de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) para translocações de vários substratos através da membrana (Davidson *et al.*, 2008). Existem vários tipos de transportadores ABC, como é o caso de glicoproteínas-P (Pgp, do inglês *P-glycoprotein*) que são proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos também designado por multirresistência (MDR, do

inglês *Multidrug resistance*) (Osorio *et al.*, 2005). Este tipo de mecanismos de resistência é de maior preocupação quando ocorre por sobre-expressão de genes que codificam estas proteínas (Sauvage *et al.*, 2009).

### 2.3.1. Inibidores de efluxo

Nos últimos anos, tem sido desenvolvida a hipótese da utilidade da associação de compostos capazes de inibir ou modular o efluxo com os atuais fármacos para combater infecções (Shokri *et al.*, 2012). Esta associação com inibidores de efluxo (EI, do inglês *Efflux inhibitors*) tem como objetivo diminuir a resistência e promover a redução da emergência de fenótipos de MDR (Piddock, 2006). Alguns exemplos de EI são o verapamil (VP), tioridazina (TZ), a clorpromazina (CPZ) e ouabaína (Ouab). O verapamil é um bloqueador de canais de cálcio utilizado no tratamento da hipertensão, arritmia cardíaca e cefaleias (Luurtsema *et al.*, 2002). A tioridazina e a clorpromazina são fármacos inibidores de ATPases dependentes de cálcio (Li *et al.*, 2015). Já a ouabaína é um fármaco inibidor de canais de potássio. O composto natural [6]-gingerol é um possível inibidor de efluxo, embora, não seja conhecido qual o seu mecanismo de ação (Mukherjee, Mandal & Bhaduri, 2001; Cao *et al.*, 2013).

Apesar de existirem dados científicos que indicam que a inibição de efluxo está associada à redução de fenótipos MDR, a sua utilização como moduladores de efluxo na clínica é dificultada pela elevada toxicidade, principalmente no caso de EI de primeira geração, como o caso de VP, TZ, CPZ e OUAB. Os inibidores de segunda geração, derivados dos inibidores de primeira geração, por sua vez, têm maior efetividade e apresentam toxicidade reduzida. Os EI de terceira geração têm melhor interação com as bombas de efluxo e menor toxicidade. Existe ainda uma nova quarta geração de EI constituída por compostos fitoquímicos com menor toxicidade capazes de diminuir os fenótipos de MDR, como poderá ser o caso de [6]-gingerol (Ponte-Sucre, 2007).

## Objetivos

Esta dissertação integra um conjunto de ensaios que têm como objetivo principal estudar e analisar o efeito de inibidores de efluxo na resposta imunitária inata e a resposta inflamatória intracelular de MØ infectados com *L. infantum*, procurando interpretar os mecanismos de ação que possam potencializar a atividade microbicida e minimizar a toxicidade para os MØ infectados. Os objetivos específicos foram:

1. Analisar a citotoxicidade de EI em MØ RAW 264.7

O efeito citotóxico de VP, TZ, CPZ, OUAB e [6]-gingerol em MØ RAW 264.7 foi analisado utilizando o método colorimétrico com azul de tetrazólio (MTT).

2. Confirmar a capacidade do VP, TZ, CPZ, OUAB e [6]-gingerol em inibir bombas efluxo de MØ RAW 264.7

A capacidade de inibição de bombas de efluxo da linha celular de MØ foi confirmada através do método fluorométrico semi-automático de quantificação em tempo real da acumulação de brometo de etídio por inibição do seu efluxo.

3. Avaliar o modelo de infecção *L. infantum* em MØ RAW 264.7

A avaliação do modelo foi realizada com base na determinação da viabilidade de *L. infantum* após infecção e fagocitose, e na capacidade de multiplicação.

4. Estimar o efeito dos EI na acidificação dos fagossomas/lisossomas

O efeito de VP, TZ, CPZ, OUAB e [6]-gingerol na acidificação dos fagossomas/lisossomas de MØ estimulados com LPS e de MØ infectados com *L. infantum* foi analisado através dos ensaios de fluorescência com Laranja de acridina e *Lysotracker red*.

5. Avaliar a atividade imunomoduladora dos EI relacionada com o stress oxidativo

A produção de radicais livres de oxigênio e azoto foi determinada através da emissão de fluorescência com dihidrorodamina 123 e por colorimetria na presença de reagente de Griess, respetivamente, em MØ estimulados com LPS e infectados com *L. infantum*.

## II. Materiais e Métodos

### 1. Material biológico

#### 1.1 Macrófagos RAW 264.7

As células RAW 264.7 derivam de uma linha de macrófagos isolados de tumores de murganhos BALB/C induzidos pelo vírus da leucemia de Abelson (ATCC ® TIB-71™).

Esta linha celular foi criopreservada em azoto líquido, em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) (do inglês *Roswell Park Memorial Institute culture medium*), suplementado com 20% soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*) e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

Após descongelação, as células foram mantidas em aderência, em meio RPMI 1640, suplementado com 10% FBS (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) 50 µg.mL<sup>-1</sup> de penicilina (Sigma-Aldrich), 50 µg.mL<sup>-1</sup> de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 10 mM de HEPES (Sigma-Aldrich) [ácido *N*-(2-Hidroxietyl)piperazina-*N'*-(2-etanosulfónico)] a 37 °C, em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono). Quando atingiam concentrações superiores a 1-3×10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, as células foram centrifugadas a 150 ×g durante 5 min e ressuspendidas em 10 mL de meio de RPMI 1640 suplementado com 10% de FBS.

Para determinar a viabilidade e concentração celular, à suspensão celular foi adicionado azul tripano na diluição de 1:2 e as células viáveis foram quantificadas por microscopia ótica, utilizando um hemocitómetro (Câmara de Neubauer).

#### 1.2 *Leishmania infantum*

O protozoário *L. infantum* (MCAN/PT/2012/IMT0005SG) é proveniente de um caso de leishmaniose canina do município do Seixal, Setúbal, Portugal. A estirpe foi mantida em murganhos BALB/c, de onde foi reisolada a partir do baço. Os promastigotas extraídos de macerado de baço foram considerados virulentos até à quarta passagem em cultura, sendo que os promastigotas com seis ou mais passagens foram considerados não virulentos (Santos-Gomes & Abranches, 1996).

Os parasitas foram cultivados em meio de Schneider (Sigma-Aldrich) (SCH) com 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de penicilina, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de estreptomicina (Sigma-Aldrich). O pH foi acertado para 7,2. A cultura de *L. infantum* foi incubada a 24 °C em estufa refrigerada (Lovibond).

Em todos os ensaios foram utilizados promastigotas na fase estacionária de crescimento. Os parasitas viáveis foram centrifugados a 1800  $\times g$  durante 10 min e ressuspendidos em meio de RPMI (1:2) com 40% de glicerol. As concentrações parasitárias foram estimadas por microscopia ótica, utilizando um hemocitómetro.

Foi também utilizada uma estirpe de *L. infantum* MHOM/MA/67/ITMAP-263 expressando uma proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *green fluorescent protein*) (gentilmente disponibilizadas pela Professora Ana Tomás, do Instituto de Biologia Molecular e Celular). Esta estirpe foi cultivada como anteriormente descrito, tendo sido adicionado ao meio 0,1  $\text{mg.mL}^{-1}$  de geneticina (G418 solução salina de dissulfato) (Sigma-Aldrich).

## **2. Modelos de resposta inflamatória**

### **2.1 Estimulação de macrófagos RAW 264.7 com LPS**

O protocolo de estimulação de MØ RAW 264.7 com LPS foi aplicado de acordo com Chou *et al.*, (2013).

O LPS é uma endotoxina derivada da membrana externa das bactérias gram-negativas. Esta molécula estimula os MØ a libertar mediadores inflamatórios, como é o caso do óxido nítrico (NO), anião superóxido, entre outros. A concentração de LPS utilizada variou conforme o ensaio desenvolvido, entre 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  e 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **2.2 Infecção de macrófagos RAW 264.7 com *L. infantum***

O protocolo de infecção das células RAW 264.7 utilizado neste estudo foi adaptado do protocolo usado para infetar as células P388D1 e que se encontra descrito em Rafael-Fernandes (2014). As células P388D1 derivam de uma linha celular originária de macrófagos de linfoma de murganhos B10. A concentração de MØ utilizados variou

conforme o ensaio desenvolvido. Contudo, foi sempre utilizada a proporção de um MØ RAW 264.7 para cada três parasitas. Após 5 h de incubação a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> foram removidas todas as leishmanias extracelulares que não infectaram MØ e adicionado meio RPMI suplementado com 10% FBS. Em todos os ensaios desenvolvidos foi utilizada *L. infantum* virulenta. A taxa de infecção foi estimada por observação ao microscópio ótico de lamela fixada com metanol e corada com Giemsa.

### **3. Avaliação do efeito modulador de compostos na atividade das bombas de efluxo de macrófagos**

Para avaliar a atividade de efluxo em MØ na presença de EI foi utilizado o método fluorométrico semi-automático em tempo real, adaptado a células eucarióticas por Spengler *et al.*, 2009. Este método que se baseia na leitura da fluorescência das células por 60 ciclos de 60 segundos cada, permite quantificar a acumulação de brometo de etídio (EtBr, do inglês *ethidium bromide*) no interior dos MØ, através da fluorescência emitida/acumulada durante os 60 minutos na presença versus ausência de inibidores de efluxo. O EtBr é um substrato universal das bombas de efluxo. Este composto gera um sinal quantificável que é aumentado quando o EtBr se acumula no interior das células eucarióticas viáveis tendo o mesmo uma reduzida fluorescência no exterior das células. Este método permite identificar compostos que atuam como inibidores de efluxo, já que quanto maior for a concentração de EtBr no interior das células promovida pela inibição do efluxo pelo composto, maior a fluorescência obtida.

Foi adicionado 5 µL de uma solução stock de EI a alíquotas de 90 µL de uma suspensão celular com 2×10<sup>6</sup> MØ RAW 264.7 por mL. As concentrações de EI utilizadas encontram-se descritas na **Tabela 1**. Ao fim de 15 min, foi adicionado uma solução de 5 µL de EtBr na concentração de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de EtBr utilizada foi otimizada de modo a utilizar a menor concentração de EtBr que gera acumulação intracelular estável e detetável pelo fluorímetro. Para tal, foi utilizado alíquotas de 90 µL de uma suspensão celular com 2×10<sup>6</sup> MØ por mL com diferentes concentrações de EtBr até se determinar a concentração de equilíbrio influxo/efluxo de 10% da escala máxima de leitura do aparelho, que designamos de VIC - valor indicativo de cut-off. O VIC foi determinado através da média das fluorescências obtidas pelas células expostas à concentração de 0,5 µg.mL<sup>-1</sup> de EtBr, não tratadas com qualquer EI, valor médio ao qual foi acrescido duas

vezes o valor do desvio padrão. As concentrações de EtBr assim determinadas e utilizadas variaram entre 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Tabela 1:** Concentrações de inibidores de efluxo utilizados nos ensaios acumulação de EtBr em macrófagos RAW 264.7.

<b>Inibidores de efluxo</b>	<b>Concentração Máxima (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Concentração Mínima (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
VP	200	25
TZ	40	5
CPZ	40	5
OUAB	0,2	0,025
[6]-gingerol	240	30

Foram realizados três ensaios independentes e cada amostra foi analisada em triplicado.

A fluorescência foi lida a 530/585 nm no termociclador Rotor-Gene<sup>TM</sup> 3000 (Corbett Research) a 37 °C a, utilizando o *software* de Análise do Rotor-Gene 6.1 (Build 93). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (Ufa). Os Ufa emitidos após 60 ciclos foram analisados por comparação com o valor indicativo de cut-off (VIC).

#### **4. Avaliação do modelo de infecção *L. infantum* em macrófagos RAW 264.7**

##### **4.1 Avaliação da viabilidade de *L. infantum* após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo**

A avaliação do modelo de infecção foi realizada através da análise de viabilidade de *L. infantum*. Após fagocitose por MØ e transformação de amastigotas intracelulares, a viabilidade de *L. infantum* foi analisada através do isolamento do parasita em meio de cultura axénico, na forma de promastigotas móveis, a partir de MØ infetados.

Numa placa de 96 poços foram infetados MØ RAW 264 ( $2 \times 10^7 \text{.mL}^{-1}$ ) com promastigotas virulentos de *L. infantum*. Foi adicionado meio RPMI 1640 suplementados com 10% de FBS (200  $\mu\text{L}$  por poço). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> na presença de EI durante 24 h, 48 h e 72 h.

Após incubação, o meio de cultura com EI foi removido e adicionado 200 µL por poço de meio de Schneider suplementado com 10% de FBS. Ao fim de 7 dias de incubação a 24°C foi realizada a contagem do número de promastigotas móveis em câmara de Neubauer. A contagem foi efetuada após diluição de 1:10 com meio de Schneider.

Para determinar possíveis diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade de parasitas isolados de macrófago ao longo dos vários tempos de incubação, e diferenças entre a viabilidade de parasitas isolados de macrófagos tratados com os diferentes EI foi utilizado o teste ANOVA one-way. Este teste estatístico foi utilizado devido aos dados terem distribuição normal. Seguidamente foi utilizado o teste Tukey HSD para determinar diferenças entre a viabilidade de parasitas isolados de macrófagos não tratados com EI e a viabilidade de parasitas isolados de macrófagos tratados com cada EI. Toda a análise estatística foi realizada através do *software* SPSS Statistics 20, sendo considerado estatisticamente significativo valores com níveis de 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).

#### **4.2 Avaliação da capacidade multiplicativa de *L. infantum* após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo**

A capacidade multiplicativa de *L. infantum* após isolamento de MØ tratados com EI foi analisada através do acompanhamento durante 3 dias consecutivos da proliferação de leishmanias provenientes de MØ tratados com EI durante 24 h, 48 h e 72 h, como esquematizado na **Figura 4**.

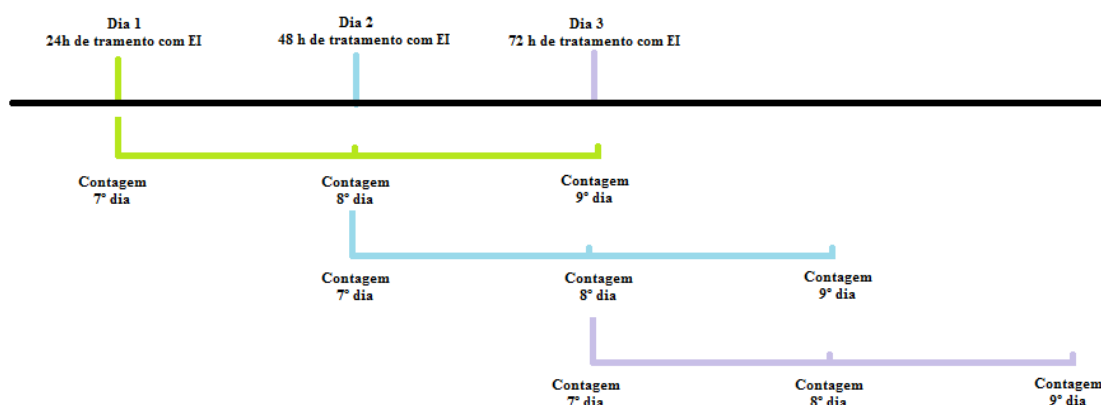
Numa placa de 96 poços foram infetados MØ RAW 264 ( $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) com promastigotas virulentos de *L. infantum*. Foi adicionado meio RPMI 1640 suplementados com 10% de FBS (200 µL por poço). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> na presença de EI durante 24 h, 48 h e 72 h.

Após incubação, o meio de cultura com EI foi removido e adicionado 200 µL por poço de meio de Schneider suplementado com 10% de FBS. Ao 7º, 8º e 9º dia de incubação a 24°C foi realizada a contagem do número de promastigotas móveis em câmara de Neubauer. A contagem foi efetuada após diluição de 1:10 com meio de Schneider.

Para determinar possíveis diferenças estatisticamente significativas entre a capacidade multiplicativa de parasitas isolados de MØ ao longo do 7º, 8º e 9º dia de proliferação em ensaios tratados com EI durante 24 h, 48 h e 72 h foi utilizado o teste

ANOVA medições repetidas, com correção de Greenhouse-Geisser. Este teste estatístico foi utilizado devido aos dados terem distribuição normal. Seguidamente foi utilizado o teste Bonferroni para determinar diferenças entre cada um dos dias de incubação de placas tratadas com EI durante 24 h, 48 h e 72h.

Toda a análise estatística foi realizada através do *software* SPSS Statistics 20, sendo considerado estatisticamente significativo valores com níveis de 5% de significância ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 4:** Esquemática do ensaio da capacidade multiplicativa de *L. infantum* após isolamento do parasita a partir de macrófagos tratados com inibidores de efluxo. A cor verde é representativa dos ensaios com macrófagos infetados tratados durante 24 h com EI. A cor azul é representativa dos ensaios com macrófagos infetados tratados durante 48 h com EI. E a cor roxa é representativa dos ensaios decorridos com macrófagos infetados tratados durante 72 h com EI.

## 5. Avaliação do efeito dos inibidores de efluxo na acidificação dos fagossomas/lisossomas

### 5.1 Avaliação da citotoxicidade dos inibidores de efluxo em células RAW 264.7

O método colorimétrico com azul de tetrazólio (MTT) foi utilizado para determinar a citotoxicidade dos inibidores de efluxo.

A concentração celular foi otimizada através de diluições seriadas de MØ em placas de 96 poços, tendo sido determinado como concentração ótima  $2,5 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> de MØ RAW 264.7. Foram realizados três ensaios independentes e cada condição foi analisada em triplicado, tendo sido utilizado como controlo células não tratadas.

Foram realizadas diluições seriadas dos EI para determinar o índice citotóxico (IC) de 90% e 50% de viabilidade celular após 48 h de exposição a EI. As concentrações máximas e mínimas dos inibidores utilizados no presente estudo encontram-se representadas na **Tabela 2**.

Após a incubação dos MØ com EI, o meio de cultura foi retirado e adicionado uma solução de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de MTT durante 1h. Por fim, a solução de MTT foi retirada e adicionado DMSO. O ensaio foi lido no ELx808™ *Absorbance Microplate Reader* a 570 nm com o *software* Microplate manager 5.2.1. Os resultados foram analisados no *software* GraphPad Prism versão 5.00. As concentrações de IC10, que asseguravam a viabilidade celular, foram utilizadas nos ensaios seguintes.

**Tabela 2:** Concentrações máximas e mínimas dos inibidores de efluxo para a determinação da citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7.

<b>Inibidores de efluxo</b>	<b>Concentração Máxima (µM)</b>	<b>Concentração Mínima (µM)</b>
VP	1280	10
TZ	100	0,781
CPZ	100	0,781
OUAB	16	0,125
[6]-gingerol	870	6,8

## 5.2 Determinação da viabilidade celular em ensaios de fluorescência

A calceína AM é um fluoróforo utilizado para determinar a viabilidade celular na generalidade das células eucarióticas. Este composto não fluorescente é convertido num fluoróforo verde fluorescente impermeável (calceína) após hidrólise de acetoximetilo por esterases intracelulares de células viáveis.

Em placas de 12 poços foi colocada uma lamela de 12 mm por poço, como matriz de adesão celular. Posteriormente, foi adicionado  $1 \times 10^6$  MØ RAW 264.7 mL<sup>-1</sup> de em 500

$\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 com 10% FBS. Este ensaio foi executado com MØ infetados por *L. infantum* e em MØ estimulados por LPS ( $100 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) durante 4 h e 24 h. As células foram expostas a EI, em concentrações não tóxicas para, pelo menos, 90% da população celular, durante 4 h e 24 h, como descrito na **Tabela 3**. Seguidamente, foi adicionado  $1 \mu\text{M}$  calceína AM em PBS  $1\times$  (tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*) a cada poço e incubado durante 30 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em atmosfera húmida com 5%  $\text{CO}_2$ . As lamelas foram retiradas dos poços e aderidas às lâminas de microscopia com verniz. As preparações foram visualizadas no microscópio de fluorescência Nikon eclipse 80i e da câmara Nikon DS-Ri1 com comprimento de onda de excitação de 495 nm e filtro de emissão de 515 nm. As imagens foram adquiridas recorrendo ao *software* NIS-Elements BR 3.2.

**Tabela 3:** Concentrações de inibidores de efluxo de IC10 em macrófagos RAW 264.7.

<b>Inibidores de efluxo</b>	<b>Concentração</b>
VP	$10 \mu\text{M}$
TZ	$1 \mu\text{M}$
CPZ	$1,5 \mu\text{M}$
OUAB	$16 \mu\text{M}$
[6]-gingerol	$30 \mu\text{M}$

### 5.3 Avaliação do pH intracelular

O pH intracelular foi analisado utilizando marcadores fluorescentes sensíveis ao pH, tais como a laranja de acridina (AO, do inglês *acridine orange*) e *lysotracker red* (LTR), que emitem fluorescência proporcional à acidez sendo esta observada através da microscopia de fluorescência.

Em cada poço de uma placa de 12 poços foi colocado uma lamela de 12 mm e adicionados  $500 \mu\text{L}$  MØ RAW 264.7 ( $1\times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$  em meio RPMI 1640 com 10% FBS). As placas foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , em atmosfera húmida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Neste ensaio foram utilizadas células estimuladas com LPS a  $100 \text{ ng.mL}^{-1}$  e células infetadas por *L. infantum* com e sem a expressão da proteína GFP. As células estiveram sujeitas à presença de EI, em concentrações não tóxicas (IC10) durante 4 e 24 h, como descrito na **Tabela 3**. A fluorescência emitida foi observada em microscopia de

fluorescência, após aderência entre lâmina e lamela com verniz e as imagens adquiridas através do *software* NIS-Elements BR 3.2.

### **5.3.1 Detecção da acidificação intracelular utilizando laranja de acridina**

A AO é um corante fluorescente catiónico metacromático capaz de atravessar membranas celulares. Geralmente, as células permeáveis têm pH neutro. Contudo, a atividade das bombas de prótons leva à protonação da célula, promovendo a acumulação de laranja de acridina em organelos ácidos, como o caso dos lisossomas. Esta ação gera a precipitação de AO formando agregados que emitem uma fluorescência vermelha. Pelo contrário, quando isto não ocorre, a AO tende a ser localizado em vesículas ácidas no citoplasma, emitindo uma cor verde fluorescente (Natale & McCullough, 1998).

A AO a 2,6  $\mu\text{M}$  em PBS 1 $\times$  foi adicionada aos MØ aderentes a lamelas em placas de 12 poços e incubadas durante 30 min a 37 °C em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. As lamelas foram aderidas às lâminas com verniz e, em seguida, foram visualizadas ao microscópio de fluorescência a 502/525 nm (cor verde) e 460/650 nm (cor vermelha). As imagens foram adquiridas através do *software* NIS-Elements BR 3.2. As imagens com ausência de fluorescência foram consideradas negativas (-). As imagens com fluorescência foram consideradas positivas (+) e com elevada intensidade de fluorescência foram classificadas como muito positivas (++)

### **5.3.2 Identificação de vesículas ácidas utilizando *Lysotracker red***

O LTR é um fluoróforo que passa livremente através das membranas celulares, sendo altamente seletivo para organelos ácidos. Este fluoróforo é considerado um marcador lisossomal.

O LTR (25 nM) foi adicionado aos MØ aderentes a lamelas em placas e as placas foram incubadas durante 30 min a 37 °C em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. As lamelas foram aderidas às lâminas com verniz, visualizadas em microscópio de fluorescência a 577/590 nm e as imagens foram adquiridas. As imagens com ausência de fluorescência foram consideradas negativas (-). As imagens com fluorescência foram consideradas

positivas (+), com elevada intensidade de fluorescência foram classificadas como muito positivas (++) e extremamente positivas (+++) imagens excessivamente fluorescentes.

## 6. Avaliação da atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo

A avaliação da atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo foi testada através da emissão de fluorescência na presença em radicais livres de oxigénio com dihidrorodamina 123 e pelo método de deteção da produção de NO na presença de reagente de Griess.

### 6.1 Produção de radicais livres de oxigénio

A dihidrorodamina 123 (DHR) é um composto não fluorescente, que na presença de ROS é oxidada, sendo convertida nas mitocôndrias em rodamina 123 fluorescente.

Em placas de 12 poços com uma lamela de 12 mm em cada poço foi adicionado 500 µL de MØ RAW 264.7 ( $1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> em meio RPMI 1640 10% FBS). As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os EI em concentrações não tóxicas para, pelo menos, 90% da população celular, como descrito na **Tabela 3** foram incubados durante 4h. Neste ensaio foram utilizadas células estimuladas com LPS (100 ng.mL<sup>-1</sup>) e células infetadas por *L. infantum*.

Seguidamente, foi adicionado 0,3 µM dihidrorodamina 123 e as placas foram incubadas durante 30 min a 37 °C em atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>. A fluorescência foi observada por microscopia de fluorescência com filtros de 500/525 nm e as imagens adquiridas. Foi utilizado como controlo positivo do ensaio 2 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As imagens com ausência de fluorescência foram consideradas negativas (-). As imagens com fluorescência foram consideradas positivas (+), com elevada intensidade de fluorescência foram classificadas como muito positivas (++) e extremamente positivas (+++) imagens excessivamente fluorescentes.

## 6.2 Detecção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico é um dos meios de defesa dos MØ para o combate de agentes infecciosos, através da capacidade dos MØ em formar espécies reativas de azoto (Chou *et al.*, 2013).

Previamente, foi adicionado por poço em placa de cultura celular de 96 poços  $5 \times 10^5$  células em meio DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), com 10% FBS. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C, em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram adicionados EI em concentrações não tóxicas para, pelo menos, 90% da população celular, como descrito na **Tabela 3**, durante 24 h. Este ensaio foi testado em células estimuladas com LPS ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e em células infetadas por *L. infantum*.

Da cultura celular preparada previamente foi retirado 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante para uma nova placa de 96 poços. Ao sobrenadante foi adicionado e 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess. Foram realizados três ensaios independentes em triplicado.

A leitura foi realizada no ELx808™ *Absorbance Microplate Reader* a 570 nm com o *software Microplate manager 5.2.1.* após 10 min de incubação com o reagente de Griess, à temperatura ambiente e resguardado da luz. Os valores obtidos foram comparados com os valores da curva padrão de nitrito de sódio. Esta curva foi determinada com base numa série de diluições sucessivas de óxido nítrico entre 100  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$ .

### III. Resultados e Discussão

#### 1. Efeito dos inibidores de efluxo na viabilidade celular

##### 1.1 Citotoxicidade dos inibidores de efluxo em RAW 264.7

A citotoxicidade calculada para 50% (IC<sub>50</sub>) e 90% (IC<sub>10</sub>) de viabilidade de MØ RAW 264.7 na presença de EI encontra-se descrita na **Tabela 4**. Os valores indicados na **Tabela 4** correspondem à exposição dos MØ RAW 264.7 aos EI durante 48 h.

**Tabela 4:** Índice citotóxico para 50% (IC<sub>50</sub>) e 90% (IC<sub>10</sub>) dos inibidores de efluxo em macrófagos RAW 264.7.

Compostos	IC <sub>10</sub>	IC <sub>50</sub>
VP	11,0 µM	99,2 µM
TZ	1,0 µM	8,8 µM
CPZ	1,5 µM	13,8 µM
OUAB	≥ 16 µM	≥ 16 µM
[6]-gingerol	29,9 µM	268,0 µM

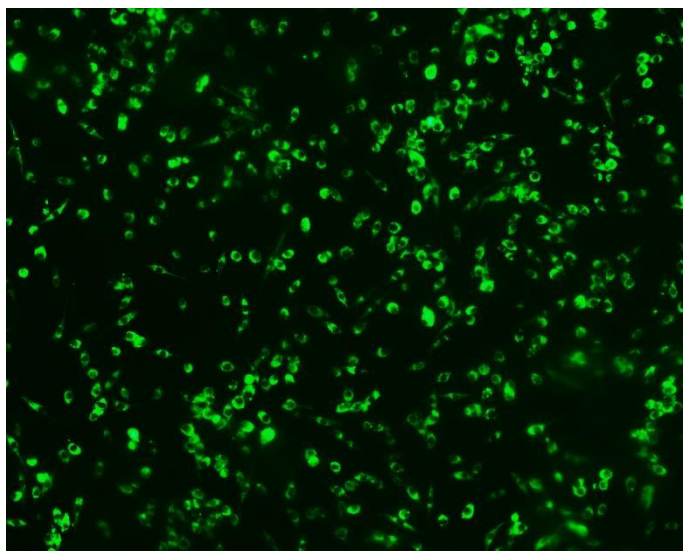
No caso da OUAB, não foi possível obter um valor concreto de IC<sub>50</sub> e IC<sub>10</sub> devido à reduzida toxicidade deste composto nestas células. Como tal, foram utilizadas concentrações iguais ou inferiores ao IC<sub>10</sub> (16 µM) nos ensaios realizados com os MØ RAW 264.7.

Os EI mais citotóxicos foram a TZ e CPZ. Já os EI que evidenciaram menor citotoxicidade foram o [6]-gingerol e a OUAB. Assim sendo, os EI que menos prejudicaram os macrófagos são o [6]-gingerol e a OUAB.

## 1.2 Viabilidade celular

A calceína AM foi utilizada em ensaios de fluorescência para avaliar a viabilidade celular. Em todos os ensaios realizados ocorreu hidrólise do éster de acetoximetilo por esterases intracelulares com emissão de fluorescência, indicando viabilidade celular, conforme é possível observar na **Figura 5**.

A adição de EI e de parasitas não alterou a viabilidade celular.



**Figura 5:** Macrófagos infectados com *L. infantum* após incubação durante 24 h com VP com emissão de fluorescência verde de Calceína AM.

## 2. Atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo em macrófagos RAW 264.7

Na ausência de EI os MØ apresentaram uma média de 6,74 UFa (unidades arbitrárias de fluorescência), um desvio padrão ( $\sigma$ ) de  $\pm 0,44$  e VIC de 7,62. O VIC foi determinado através da média das fluorescências obtidas pelas células expostas à concentração de  $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de EtBr, não tratadas com qualquer EI, valor médio ao qual foi acrescido duas vezes o valor do desvio padrão. A média das fluorescências obtidas pelas células tratadas com diferentes concentrações de EI está representada na **Tabela 5**. As UFa superiores ao VIC estão indicados na **Tabela 5** a preto e os valores inferiores ao VIC estão indicados a cinzento.

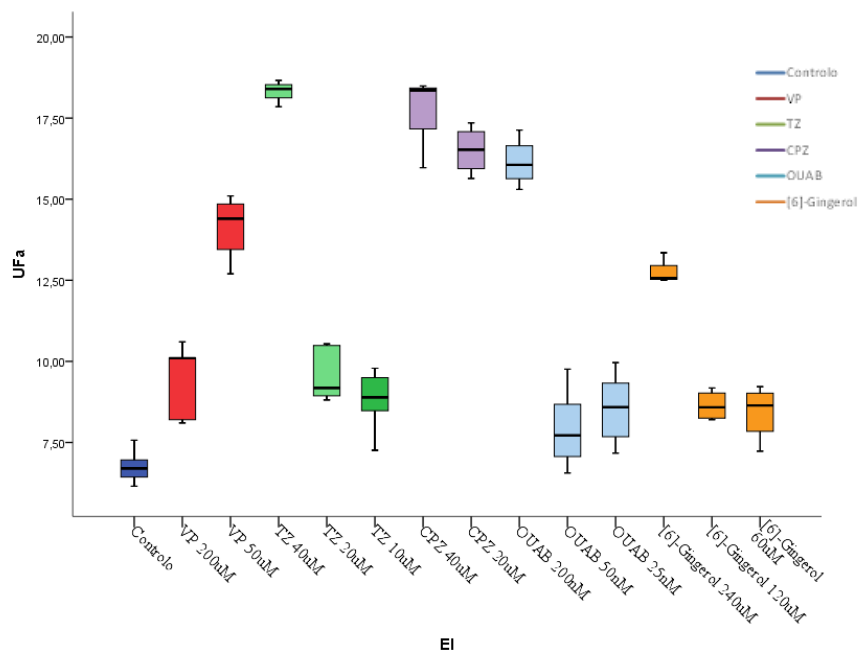
As concentrações de IC10 destes EI não apresentavam acumulação de EtBr em MØ RAW 264.7. Conseqüentemente, as concentrações dos EI utilizadas neste ensaio de 60 min são iguais ou superiores às concentrações citotóxicas para 90% da viabilidade celular (IC10) após 48 h na presença dos EI. Contudo a viabilidade celular não foi afetada.

**Tabela 5:** Acumulação de EtBr em macrófagos tratados com EI. As unidades arbitrárias de fluorescência (UFa) superiores ao valor indicativo de cut-off (VIC) estão indicados a preto e os valores inferiores ao VIC estão indicados a cinzento.

<b>EI</b>	<b>Concentração dos EI (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Médias das UFa <math>\pm \sigma</math></b>
<b>VP</b>	200	9,4 $\pm$ 1,0
	100	7,1 $\pm$ 0,6
	50	14,1 $\pm$ 0,9
	25	6,9 $\pm$ 1,0
<b>TZ</b>	40	18,3 $\pm$ 0,3
	20	9,6 $\pm$ 0,8
	10	8,8 $\pm$ 0,8
	5	6,8 $\pm$ 0,5
<b>CPZ</b>	40	17,8 $\pm$ 1,0
	20	16,5 $\pm$ 0,6
	10	6,3 $\pm$ 0,7
	5	6,8 $\pm$ 0,7
<b>OUAB</b>	0,2	16,1 $\pm$ 0,7
	0,1	7,2 $\pm$ 0,6
	0,050	8,2 $\pm$ 1,0
	0,025	8,3 $\pm$ 0,9
<b>[6]-gingerol</b>	240	12,8 $\pm$ 0,4
	120	8,6 $\pm$ 0,4
	60	8,4 $\pm$ 0,7
	30	7,0 $\pm$ 1,0

Os MØ tratados com VP 200  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , TZ 40  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , CPZ 40  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{M}$ , OUAB 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$  e 0,025  $\mu\text{M}$ , [6]-gingerol 240  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$  e 60  $\mu\text{M}$

apresentam valores de UFa superiores ao VIC, como indica a **Figura 6**. Estes resultados sugerem que os EI atuam como moduladores de transportadores de membrana, diminuindo o efluxo de EtBr. Esta modulação poderá assinalar a inibição de efluxo através da modulação de bombas de efluxo (Spengler *et al.*, 2009).



**Figura 6:** Acumulação de EtBr em macrófagos tratados com EI. Na figura encontram-se representados unicamente os EI e as respectivas concentrações que apresentaram unidades arbitrárias de fluorescência (UFa) superiores ao valor indicativo de cut-off (VIC).

### 3. Infecção de macrófagos RAW 264.7 por *L. infantum*

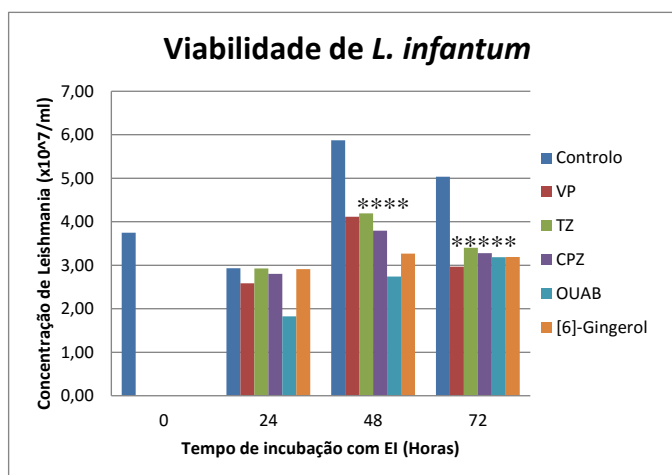
A avaliação do modelo de infecção *L. infantum* em MØ RAW 264.7 foi realizada com *L. infantum* virulenta. Todos os ensaios realizados têm taxas de infecção entre 10% e 45%.

#### 3.1 Viabilidade de *L. infantum* após o isolamento a partir de macrófagos tratados com inibidores de efluxo

Nos ensaios de viabilidade de *L. infantum* em MØ RAW 264.7 observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade de parasitas isolados de MØ tratados com os diferentes EI [ $F(5;118)=8,663$   $P<0,001$ ]. Foi ainda possível verificar que

a diminuição da viabilidade parasitária era estatisticamente significativa entre parasitas isolados de macrófagos não tratados e tratados com EI ( $P_{VP}=0,001$ ;  $P_{TZ}=0,023$ ;  $P_{CPZ}=0,015$ ;  $P_{OUAB}<0,001$ ;  $P_{[6]\text{-gingerol}}<0,001$ ). Estes resultados indicam que todos os EI em estudo diminuem a viabilidade dos promastigotas de *L. infantum*. Na **Figura 7** é possível visualizar que a OUAB e o [6]-gingerol são os EI que mais diminuíram a viabilidade dos promastigotas ao longo de todos os tempos de incubação. Já a TZ é o EI que menos diminuiu a viabilidade de *L. infantum* ao longo de todos os tempos de incubação.

Foi verificado que existem diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade de parasitas isolados de MØ ao longo dos vários tempos de incubação [ $F(3;118)=15,254$   $P <0,001$ ]. Foi ainda possível verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade parasitária de isolados de MØ não tratados e tratados durante 24 h ( $P_{T0 \text{ e } T1} <0,001$ ), tratados durante 24 h e 48 h ( $P_{T1 \text{ e } T2} <0,001$ ) e entre tratados durante 24 h e 72 h ( $P_{T1 \text{ e } T3} <0,001$ ). Já pelo contrário, não existem diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade parasitária de isolados de MØ tratados durante 48 h e 72 h ( $P_{T2 \text{ e } T3}=0,256$ ). Isto indica que o tempo de exposição aos EI influencia a viabilidade de *L. infantum*.



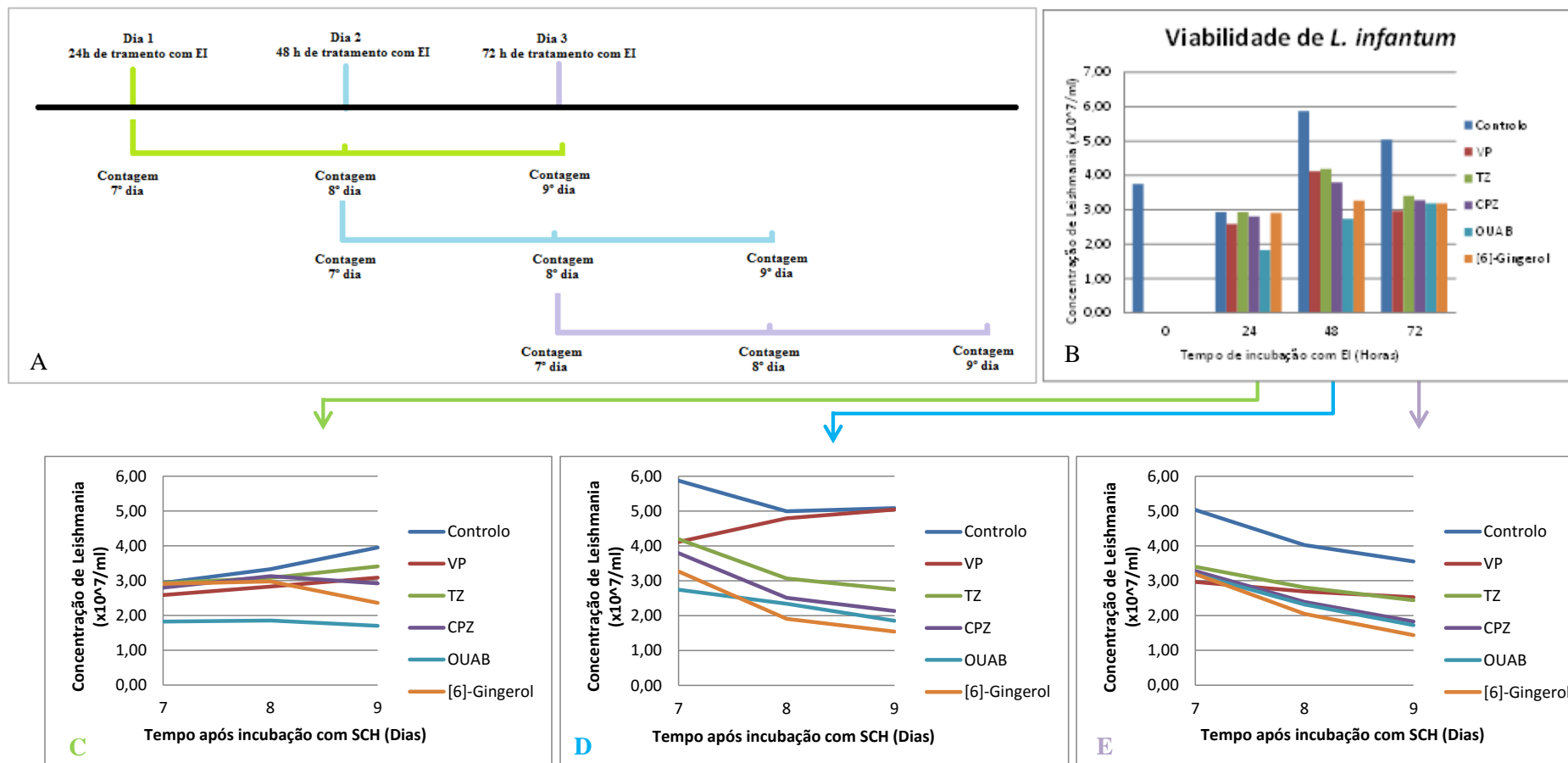
**Figura 7:** Viabilidade de *L. infantum* isolados de macrófagos tratados com inibidores de efluxo durante 24 h, 48 h e 72 h, ao 7º dia de incubação com meio de Schneider. As 0 h de incubação são representativas da viabilidade de *L. infantum* isolados de macrófagos não tratados com inibidores de efluxo. Os resultados são expressos pela média de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição. \* ( $P <0,05$ ) indica diferenças significativas quando se compararam parasitas isolados de células tratadas com parasitas isolados de células não tratadas.

Na **Figura 7** é possível observar que após 24 h de incubação a 37 °C na presença de EI ocorre uma diminuição do número de leishmanias, seguido de um aumento às 48 h. Embora com 24 h de incubação com EI não se tenha verificado diferenças estatísticas atribuíveis aos EI ( $P_{VP}=0,963$ ;  $P_{TZ}=0,999$ ;  $P_{CPZ}=0,985$ ;  $P_{OUAB}=0,232$ ;  $P_{[6]\text{-gingerol}}=0,999$ ), com 48 h de incubação com EI foram observadas diminuição significativa de viabilidade parasitária no caso dos promastigotas isolados de MØ sujeitos ao [6]-gingerol, OUAB, CPZ ou TZ quando comparado com o controlo. Apenas o VP não parece ter tido um efeito importante na viabilidade ( $P_{VP}=0,055$ ;  $P_{TZ}=0,047$ ;  $P_{CPZ}=0,008$ ;  $P_{OUAB}<0,001$ ;  $P_{[6]\text{-gingerol}}<0,001$ ). Com 72 h de incubação com EI, a diferença da viabilidade parasitária relativamente ao controlo (parasitas isolados de MØ infetados) foi mais acentuada, sugerindo que o contacto prévio das formas parasitárias intracelulares (amastigotas) com os EI influenciam a viabilidade das formas parasitárias extracelulares (promastigotas) ( $P_{VP}=0,014$ ;  $P_{TZ}=0,049$ ;  $P_{CPZ}=0,046$ ;  $P_{OUAB}<0,001$ ;  $P_{[6]\text{-gingerol}}=0,006$ ).

### 3.2 Capacidade multiplicativa de *L. infantum* após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo

Nos ensaios de capacidade multiplicativa de *L. infantum* após fagocitose por MØ RAW 264.7 sujeitos aos EI durante 24 h foi verificado que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a capacidade multiplicativa de parasitas isolados de MØ ao longo do 7º, 8º e 9º dia de proliferação [ $F(1,128; 33,838)=1,508$ ;  $P=0,231$ ;  $\eta^2_p=0,048$ ]. Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos dias de proliferação (7º dia vs 8º dia  $P=0,821$ ) (8º dia vs 9º dia  $P=1,0$ ) (7º dia vs 9º dia  $P=0,549$ ). Na **Figura 8 C** é possível observar que *L. infantum* mantém a capacidade de multiplicar-se. Porém, só se verificou aumento progressivo da população, ainda que ligeiro, no controlo (parasitas isolados de MØ infetados) e nos parasitas que provieram de MØ tratados com TZ e com VP. No caso de parasitas isolados de MØ tratados com OUAB e com CPZ, o número de promastigotas pareceu estabilizar. O tratamento prévio dos MØ com [6]-gingerol parece ter conduzido ao decréscimo da população parasitária. Estes resultados sugerem que os EI com maior capacidade para reduzir a multiplicação de *L. infantum* são a OUAB, o CPZ e o [6]-gingerol.

Foi também possível concluir que existem diferenças estatisticamente significativas entre a capacidade multiplicativa de parasitas isolados de MØ ao longo do 7º, 8º e 9º dia de proliferação em ensaios tratados com EI durante 48 h [ $F(1,147; 33,269)= 36,600$ ;  $P < 0,001$ ;  $\eta^2_P=0,558$ ] e 72 h [ $F(1,241; 37,244)= 57,523$ ;  $P < 0,001$ ;  $\eta^2_P=0,657$ ]. Foram, por fim, analisadas as diferenças entre cada um dos dias de proliferação tratados com EI durante 48 h e 72 h e existem diferenças estatisticamente significativas entre todos os dias ( $P < 0,001$ ). Na **Figura 8 D** e **Figura 8 E** é possível observar que, com o passar do tempo, o número de leishmanias tendia a diminuir, exceto em leishmanias provenientes de MØ tratados com VP durante 48 h. Este facto pode ser representativo do aumento do tempo de exposição aos EI que parece beneficiar a morte de *L. infantum*. Contudo, em ambos os casos, o número de leishmanias provenientes de MØ não tratados (controlo) também tendia a diminuir. Este resultado pode indicar que a disponibilidade de nutrientes do meio encontrava-se diminuída, provocando a morte de alguns parasitas.



**Figura 8:** Esquematização temporal do ensaio da capacidade multiplicativa de *L. infantum* após isolamento de macrófagos tratados com inibidores de efluxo (A). Viabilidade de *L. infantum* isolada de macrófagos tratados com inibidores de efluxo durante 24 h, 48 h e 72 h, ao 7º dia de incubação com meio Schneider. As 0 h de incubação são representativas da viabilidade de *L. infantum* isolados de macrófagos não tratados com inibidores de efluxo, ao 7º dia de incubação com meio Schneider (B). Acompanhamento, ao longo de três dias, da capacidade multiplicativa de promastigotas de *L. infantum* isolados de macrófagos RAW 264.7 que foram tratados com EI durante 24 h (C), 48 h (D) e 72 h (E). Os resultados são expressos pela média de três experiências independentes e, de pelo menos, três réplicas por condição.

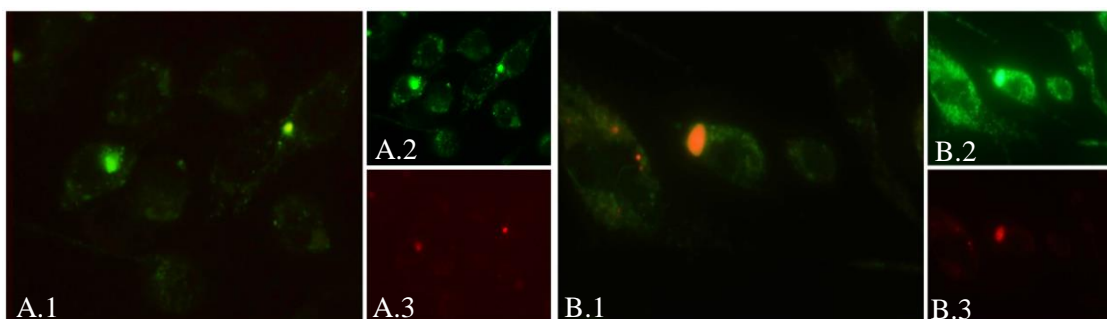
\* ( $P \leq 0,05$ ) indica diferenças significativas quando se compararam parasitas isolados de células tratadas com parasitas isolados de células não tratadas.

#### 4. pH intracelular

##### 4.1 Modelação da acidificação intracelular pelos inibidores de efluxo

Os ensaios com AO foram realizados em células não infetadas, em células estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* como indica a **Tabela 6**. A acumulação de AO em organelos extremamente acídicos promove a formação de agregados, emitindo fluorescência vermelha. Por outro lado, quando isto não ocorre, a AO tende a ficar localizada no citoplasma em vesículas ligeiramente acídicas, emitindo fluorescência verde (Natale & Mccullough, 1998). Os resultados obtidos foram comparados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sendo considerado extremamente fluorescentes (+++) os MØ com emissão de fluorescência equiparada à emissão de MØ com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A principal diferença observada entre estes ensaios foi a formação de zonas fluorescentes esféricas de grandes dimensões no citoplasma em células infetadas com *L. infantum*. Este resultado pode indicar a formação de fagolisossomas muito acídicos. Os mesmos ensaios foram realizados com a presença de EI durante 4 h e 24 h. A emissão de fluorescência não apresentou diferenças entre os ensaios de 4 h e de 24 h. Contudo, foi observado um aumento da área fluorescente em células infetadas com *L. infantum*, como demonstrado na **Figura 9**. Este resultado pode indicar a formação de fagolisossoma acídicos de maiores dimensões ao longo do tempo de incubação de EI.



**Figura 9:** Macrófagos infetados com *L. infantum* após incubação durante 4h (A) e 24 h (B) com VP com emissão de fluorescência verde (2) e vermelha (3) de AO. Nas imagens 1 é possível observar a sobreposição das imagens B e C (Amplificação 1000x).

Apesar de emitirem fluorescência verde, foi observado que não existe emissão de fluorescência vermelha em células não infetadas, em células infetadas com *L. infantum* na presença de [6]-gingerol em células estimuladas com LPS, à exceção das células estimuladas com LPS na presença de VP. Este resultado indica que, nestes casos, o pH intracelular é apenas ligeiramente ácido.

Em contrapartida, em todas as imagens obtidas com células infetadas por *L. infantum* (à exceção de células infetadas na presença de [6]-gingerol), e em células estimuladas com LPS na presença de VP houve emissão de fluorescência vermelha, como é o caso da **Figura 9 C**. Este resultado indicia que o pH é extremamente ácido.

Foi possível observar emissão de fluorescência verde em todos os casos analisados, à exceção do controlo, das células não infetadas na presença de [6]-gingerol e ainda das células estimuladas com LPS na presença de [6]-gingerol. Estes resultados sugerem que o pH é apenas ligeiramente ácido. Uma possível razão para a falta de emissão de fluorescência verde e vermelha na presença de [6]-gingerol é este ser um composto fitoquímico anti-inflamatório capaz de reduzir a acidificação do meio.

O VP demonstra ser o EI que induz maior intensidade de fluorescência verde, tanto em MØ estimulados com LPS, como em MØ infetados com *L. infantum*, como demonstra a **Figura 9 B**. A TZ, o CPZ e a OUAB apresentam emissão de fluorescência verde em todos os casos estudados. Estes resultados sugerem que o VP é o EI mais eficiente a promover a acidificação intracelular.

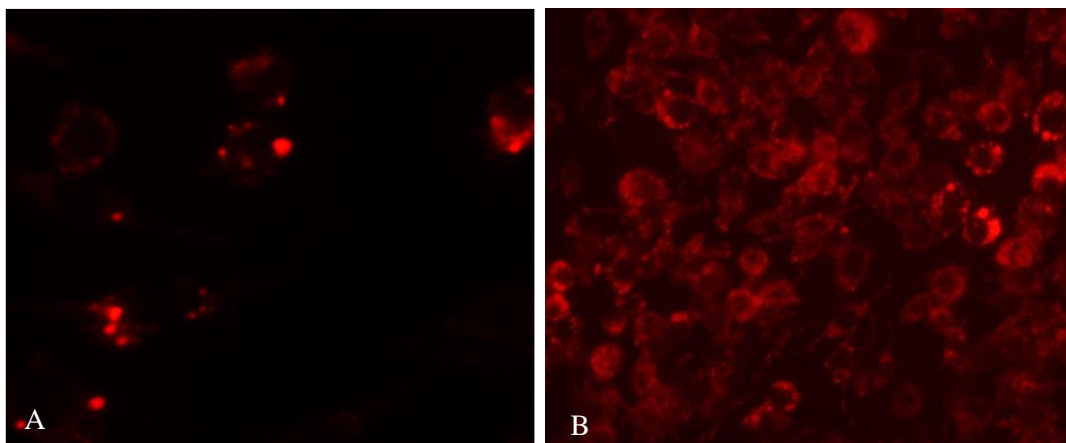
**Tabela 6:** Emissão de fluorescência de AO em células não infetadas, estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* na presença de EI, durante 4 h e 24 h.

4h/24 h	Sem infeção		Estimulação LPS		Infeção <i>L. infantum</i>	
	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho	Verde	Vermelho
<b>Controlo</b>	-	-	+	-	+	+
<b>VP</b>	+	-	++	+	+	++
<b>TZ</b>	+	-	+	-	+	+
<b>CPZ</b>	+	-	+	-	+	++
<b>OUAB</b>	+	-	+	-	+	+
<b>[6]-gingerol</b>	-	-	-	-	+	-

## 4.2 Identificação de vesículas acídicas

Os ensaios de LTR foram realizados em células não infetadas, em células estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* como indica a **Tabela 7**. Os mesmos ensaios foram realizados com a presença de EI durante 4 h e 24 h. A emissão de fluorescência não apresentou diferenças entre os ensaios de 4 h e de 24 h. Contudo, foi observado um aumento da área fluorescente em células infetadas com *L. infantum*, como demonstrado na **Figura 10**. Este resultado pode indicar a formação de fagolisossoma acídicos de maiores dimensões ao longo do tempo de incubação de EI.

A principal diferença observada entre estes ensaios foi a formação de zonas fluorescentes esféricas em células infetadas com *L. infantum*. Este resultado pode indicar a fusão de lisossomas com fagossomas, formando fagolisossomas de grandes dimensões. O resultado obtido é coerente com os resultados obtidos com a AO.



**Figura 10:** Macrófagos infetados por *L. infantum* incubados durante 4h (A) e 24 h (B) com VP emitem fluorescência vermelha quando incubados com LTR (Ampliação 400x).

Não ocorreu fluorescência positiva no caso das células não infetadas na presença de CPZ e em células infetadas na presença de CPZ, OUAB e [6]-gingerol. Este pode ser indicativo de que *L. infantum* é capaz de anular o feito destes EI.

A fluorescência foi elevada em células infetadas e não infetadas na presença de VP e em células estimuladas com LPS na presença de [6]-gingerol. A fluorescência foi extremamente elevada em células estimuladas com LPS na presença de VP. Este facto indica que o VP é capaz de aumentar a atividade enzimática dos lisossomas através

diminuição do pH. Uma vez que o VP na presença de células estimuladas com LPS aumenta a fluorescência emitida, é possível afirmar que este EI é capaz de acumular o seu efeito ao nível da redução do pH, ao efeito natural do LPS sobre os MØ.

Por fim, em todas as restantes células (não infetadas tratadas com TZ, OUAB e [6]-gingerol, células estimuladas com LPS não tratadas e tratadas com TZ, CPZ e OUAB, e ainda células infetadas com *L. infantum* não tratadas e tratadas com TZ) a fluorescência foi positiva, o que indica a ação de enzimas lisossomais.

**Tabela 7:** Emissão de fluorescência de LTR em células não infetadas, estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* na presença de EI, durante 4 h e 24 h.

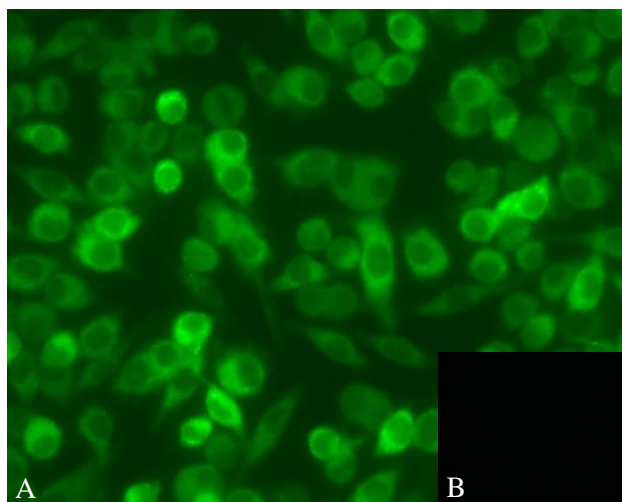
<b>4h/24 h</b>	<b>Sem infecção</b>	<b>Estimulação LPS</b>	<b>Infeção <i>L. infantum</i></b>
<b>Controlo</b>	-	+	+
<b>VP</b>	++	+++	++
<b>TZ</b>	+	+	+
<b>CPZ</b>	-	+	-
<b>OUAB</b>	+	+	-
<b>[6]-gingerol</b>	+	++	-

## 5. Atividade imunomoduladora dos inibidores de efluxo

### 5.1 Produção de radicais livres de oxigénio em macrófagos

Os ensaios de ROS foram realizados em células não infetadas, em células estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* como indica a **Tabela 8**.

Foi possível observar emissão elevada de fluorescência em todos os ensaios realizados na presença de VP, indicando que este EI induz o aumento da produção de ROS, como demonstra a **Figura 11**.



**Figura 11:** Macrófagos estimulados com LPS após 4 h de incubação com VP emitem fluorescência de verde quando incubadas com DHR (A). Macrófagos estimulados com LPS após 4 h de incubação sem EI não emitem fluorescência de verde quando incubadas com DHR (B) (Amplificação 400x).

Na presença da TZ foi verificado aumento da produção de ROS em células não infetadas e em células infetadas. Contudo, o mesmo não foi verificado em células estimuladas com LPS tratadas com TZ. Este facto indica que na presença de LPS a capacidade da TZ em induzir a produção de ROS fica neutralizada.

Em células não infetadas e em células estimuladas com LPS tratadas com CPZ foi observado aumento da produção de ROS. Porém, em células infetadas com *L. infantum* e tratadas com CPZ não foi observada a produção de ROS. Este resultado pode ser indicativo que *L. infantum* é capaz de anular a ação do CPZ.

A OUAB não induz a fluorescência em células infetadas e não infetadas com *L. infantum*. Todavia, este EI causou a emissão de fluorescência em células estimuladas com LPS. Este facto indica que, neste caso, a OUAB induz a produção de ROS em células estimuladas com LPS, o que sugere a sua capacidade de resposta eficiente a estímulos inflamatórios.

Conforme esperado, o [6]-gingerol não induziu a emissão de fluorescência em nenhum dos casos estudados. Este acontecimento poderá ser devido a este ser um composto fitoquímico anti-inflamatório capaz de atenuar o efeito da resposta inflamatória.

**Tabela 8:** Emissão de fluorescência de DHR em células não infetadas, estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* na presença de EI, durante 4 h.

4h	Sem infecção	Estimulação LPS	Infeção <i>L. infantum</i>
<b>Controlo</b>	-	-	-
<b>VP</b>	++	++	++
<b>TZ</b>	+	-	+
<b>CPZ</b>	+	+	-
<b>OUAB</b>	-	+	-
<b>[6]-gingerol</b>	-	-	-

## 5.2 Produção de óxido nítrico

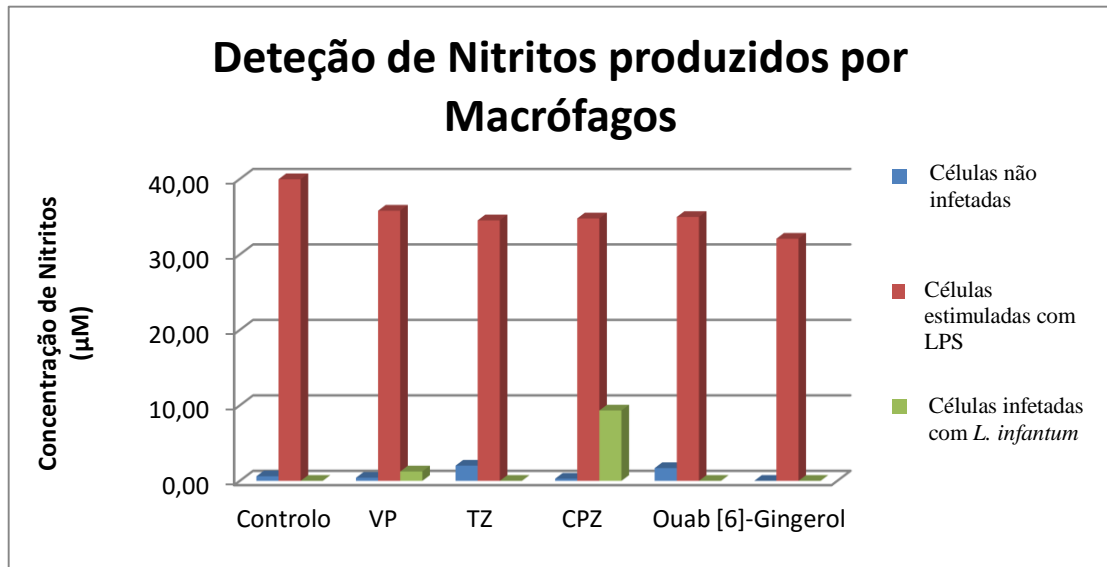
Os ensaios de produção de NO foram realizados em células não infetadas, em células estimuladas com LPS e em células infetadas com *L. infantum* como indica a **Figura 12**.

Como era previsto, a principal diferença observada entre estes ensaios é que na presença de LPS a produção de nitritos aumenta drasticamente. Isto quer dizer que a estimulação com LPS está associada à ativação de RNS.

Foi possível observar que células não infetadas tratadas com TZ e OUAB exibiram aumento da produção de nitritos em relação a células não tratadas. Este aumento indica que estes dois EI são capazes de induzir, só por si, as células a produzir RNS. Em todas as restantes células não infetadas, tratadas com EI, não foi observada produção de nitritos.

Células estimuladas com LPS e tratadas com [6]-gingerol foram as que mais reduziram a produção de nitritos relativamente a células estimuladas com LPS não tratadas. Este resultado está de acordo com o estatuto de composto fitoquímico anti-inflamatório. Seguidamente, os EI que mais reduzem a produção de nitritos em macrófagos estimulados com LPS são a TZ, CPZ, OUAB e, por último, o VP.

Células infetadas com *L. infantum* tratadas com VP e CPZ apresentam um ligeiro aumento da produção de nitritos em relação a células infetadas com *L. infantum* não tratadas. Este fato indica que quando na presença de células infetadas com *L. infantum* estes EI ativam a via de produção de RNS. Os restantes EI, na presença de células infetadas com *L. infantum* não tiveram qualquer ação detetável em relação a células infetadas não tratadas.



**Figura 12:** Deteção de nitritos produzidos por macrófagos não infetados, estimulados com LPS e infetados com *L. infantum* na presença de EI durante 24 h.

## 6. Conclusões

A resposta imune inata inflamatória tem um papel importante na defesa do organismo. Os MØ são células do sistema imunitário que desempenham um papel essencial no combate contra agentes patogênicos. O recurso a EI pode ter um impacto relevante na atividade inflamatória dos MØ. Neste caso, os EI não poderão ser administrados em concentrações tóxicas para a célula. Assim, um dos primeiros objetivos deste trabalho foi determinar a citotoxicidade dos EI, procurando minimizar eventuais danos provocados na célula. De todos os EI analisados no presente trabalho, o [6]-gingerol, um composto fitoquímico, foi o EI que revelou menor citotoxicidade, seguido de OUAB, VP, CPZ e TZ. Estudos citotóxicos realizados em MØ P388D1 tratados com VP e TZ revelaram concentrações de IC10 aproximadas às concentrações obtidas em MØ RAW 264.7 (IC10 de MØ P388D1: VP= 4 µM e TZ=2,6 µM) (Rafael-Fernandes, 2014). Com bases nestas observações é possível afirmar que a semelhança de concentrações estimadas de EI em dois estudos distintos de linhas celulares macrofágicas de diferentes origens sugere alguma estabilidade na atividade dos EI. Isto indica que será certamente vantajoso no desenvolvimento de estudos futuros.

Os resultados de citotoxicidade foram validados por observação microscópica com calceína AM, um marcador de viabilidade fluorescente. Em ensaios de fluorescência foi possível confirmar que os MØ estavam viáveis, permitindo concluir que as células em estudo estavam em condições de desempenharem o seu papel no sistema imunitário.

A capacidade moduladora da atividade dos transportadores de membrana dos EI na linha macrofágica utilizada neste estudo foi confirmada através do método de acumulação de EtBr, substrato universal de bombas de efluxo. Todos os EI utilizados no presente estudo, VP, TZ, CPZ, OUAB e [6]-gingerol, atuaram como inibidores de bombas de efluxo. Tanto quanto sabemos, foi provado nesta dissertação pela primeira vez que o [6]-gingerol pode atuar como inibidor de efluxo em células eucariotas. No futuro será vantajoso apostar em ensaios para determinar que mecanismos estão envolvidos na inibição de efluxo deste composto.

Para analisar mecanismos de ação microbicidas em MØ foi necessário utilizar modelos de infecção e estimulação do processo inflamatório. Para tal, foi escolhido um estímulo de origem bacteriana e um modelo de infecção protozoário. Neste caso, o LPS, componente da membrana externa das bactérias gram-negativas foi o escolhido devido a

ser um ligando de TLR4, um mediador de imunidade inata que estimula os MØ a produzir citocinas pró-inflamatórias. A escolha do modelo de infecção recaiu sobre o parasita *L. infantum*, devido a este ser um parasita intracelular obrigatório de MØ.

O efeito dos EI na viabilidade e na capacidade multiplicativa de promastigotas foi analisado através do isolamento do parasita a partir de MØ sujeitos à ação dos moduladores de bombas de efluxo, com o objetivo de analisar a ação microbicida dos MØ tratados com EI. Verificou-se que todos os EI diminuíaam a viabilidade de *L. infantum*, sendo que a OUAB e [6]-gingerol foram os EI com maior capacidade leishmanicida. É de salientar, que coincidentemente, estes são os EI com menor toxicidade e que mais auxiliam os macrófagos na sua ação microbicida. Com o estudo da capacidade multiplicativa da forma parasitária extracelular, foi possível concluir que MØ infetados tinham de estar sobre o efeito dos EI durante um período superior a 24 h para que a capacidade multiplicativa dos promastigotas seja afetada negativamente. Com isto é possível colocar a hipótese de que quanto maior for o tempo de exposição aos EI, menor será a capacidade replicativa de *L. infantum*. Em contrapartida, nenhum dos EI foi capaz de eliminar por completo a infecção por *Leishmania*. É de ressaltar, que mais uma vez, o [6]-gingerol e a OUAB são os EI com maior capacidade de redução da multiplicação de *L. infantum*. No futuro, seria benéfico testar a associação destes EI com fármacos anti-leishmania, como por exemplo a miltefosina, fármaco de administração oral, também substrato de bombas de efluxo.

A acidificação intracelular foi testada com AO e a localização dos lisossomas/fagolisossomas com LTR para determinar o efeito dos EI na ativação de mecanismos microbicidas em MØ. Foi possível verificar que quanto maior o tempo de incubação após a infecção, maior era o tamanho dos fagolisossomas e maior a acidificação. VP demonstrou ser um EI com maior capacidade para induzir a acidificação intracelular, tanto em células estimuladas com LPS, como em células infetadas. É possível afirmar que VP em células estimuladas com LPS aumenta a sua ação sobre a atividade lisossomal, provavelmente através da ativação hidrolases que provem a acidificação intracelular. Já a CPZ demonstrou possuir características similares, que foram evidentes em células infetadas com *L. infantum*. [6]-gingerol parece ser um imunomodulador celular, regulando negativamente a acidificação de células infetadas com *L. infantum* e estimuladas com LPS. Contudo, sendo possível observar a localização de lisossomas e fagolisossomas em células incubadas na presença deste EI, é provável que o [6]-gingerol utilize uma via alternativa à acidificação, como mecanismo microbicida.

A produção de ROS é altamente tóxica para microrganismos fagocitados (Kapetanovic, Bokil & Sweet, 2015). O VP parece atuar como oxidante, levando à produção de ROS em todos os casos estudados. A TZ foi capaz de conduzir ao aumento da produção de ROS em células infetadas e não infetadas. Isto poderá ser indicativo que VP e TZ são capazes de ultrapassar a inibição induzida pelo parasita e induzir a produção de ROS. Já CPZ também parece agir como um oxidante, aumentando a produção de ROS. Contudo *L. infantum* parece ser capaz de interferir, anulando, a capacidade oxidativa detetável do CPZ. É possível que VP, TZ e CPZ ao atuarem sobre o transporte de cálcio através das membranas celulares regulem indiretamente o aumento da produção de ROS pelos MØ. Já a OUAB apenas aumenta a produção de ROS em células previamente estimuladas, indicando que o efeito deste EI é dependente de outros fatores como por exemplo do LPS. Porém, [6]-gingerol parece não ter sido capaz de induzir a produção de ROS em nenhum dos casos estudados. Contudo, [6]-gingerol é descrito com antioxidante, podendo indicar que este tem um resultado ambíguo. Uma possível explicação é que [6]-gingerol tenha promovido a alteração da expressão de COX-2 e de NF-κB regulando negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, como é o caso de TNF-α e IL-1β. Porém,

A produção de RNS é um mecanismo de curta duração. Neste estudo, o LPS foi utilizado como um controlo positivo do ensaio, devido a este ser descrito como um estimulador de RNS (Kassim *et al.*, 2012). A TZ e a OUAB demonstraram ser capazes de induzir a produção de RNS em células não infetadas. Contudo, em células infetadas por *Leishmania*, o seu mecanismo de ação é anulado. Já VP e CPZ demonstraram contribuir para a produção de RNS em células infetadas com *L. infantum*. Isto indica que o seu mecanismo de ação é ativado pela infeção. Contudo, comparando com os resultados obtidos anteriormente, é possível afirmar que este não é o mecanismo mais eficaz para diminuir a viabilidade parasitária. Mais uma vez, [6]-gingerol demonstrou ser um inibidor de RNS, diminuindo a concentração de nitritos em todos os casos analisados. Este fato é justificado pela sua ação como composto fitoquímico anti-inflamatório.

A presente dissertação teve como objetivo principal analisar o efeito dos EI da resposta inflamatória inata de MØ, procurando interpretar mecanismos subjacentes à regulação dos mecanismos microbicidas. Este estudo indica que a utilização de EI pode vir a ser uma mais-valia em casos de infeção por *L. infantum*, auxiliando os mecanismos de ação intracelular dos MØ. Contudo, a acidificação intracelular não demonstrou ser o mecanismo mais eficaz para a morte do parasita.

O presente estudo também colocou em evidência que o [6]-gingerol e a OUAB são os EI mais eficazes na redução da viabilidade e replicação parasitária.

Futuramente será vantajoso apostar em estudos de associação de EI com fármacos leishmanicidas. Devido à baixa toxicidade dos EI, estes podem diminuir a resistência e promover a redução de fenótipos de MDR.

## 7. Referências

Aeschbach R, Loliger J, Scott C, Murcia A, Butler J, Halliwell B & Aruoma O (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, 32(1):31–36.

Al-Mutawakel K, Scutaru C, Shami A, Sakr M, Groneberg DA & Quarcoo D (2010). Scientometric analysis of the world-wide research efforts concerning Leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 3:14.

Anderson D (1996). Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 350(1):103–108.

Areschoug T, Gordon S (2009). Scavenger receptors: Role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 11(8):1160–1169.

Bianchi MDLP & Antunes LMG (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, 12(2):123–130.

Bogdan C & Röllinghoff M (1998). The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, 28(1):121–134.

Bogdan C, Rollinghoff M & Solbach W (1990). Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today*, 6(6):183–187.

Cao G-Y, Yang X-Y, Xu W & Li F (2013). New inhibitors of nitric oxide production from the seeds of *Myristica fragrans*. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 62:167–71. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23994084>, accessed 10 Dezembro 2014).

Chou S, Peng H-Y, Hsu J-C, Lin C-C & Shih Y (2013). *Achillea millefolium* L. Essential Oil Inhibits LPS-Induced Oxidative Stress and Nitric Oxide Production in. *International Journal of Molecular Sciences*, 2:12978–12993.

Davidson AL, Dassa E, Orelle C & Chen J (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and molecular biology reviews* :

MMBR, 72(2):317–64, table of contents. (<http://mibr.asm.org/content/72/2/317>, accessed 20 Agosto 2015).

Deutschman CS & Tracey KJ (2014). Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity*, 40(4):463–475. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.001>).

Di Mari J, Saada J, Mifflin R, Valentich J & Powell, D (2007). HETEs enhance IL-1-mediated COX-2 expression via augmentation of message stability in human colonic myofibroblasts. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 293(4):G719–28. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17640979>).

Doyle SL & O’Neill L J (2006). Toll-like receptors: From the discovery of NFκB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochemical Pharmacology*, 72(9 SPEC. ISS.):1102–1113.

Eissenberg LG, Goldman WE & Schlesinger PH (1993). *Histoplasma capsulatum* modulates the acidification of phagolysosomes. *The Journal of Experimental Medicine*, 177(6):1605–1611.

Franchi L, Warner N, Viani K & Nuñez G (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews*, 227(1):106–128.

Fukata M, Vamadevan AS & Abreu MT (2009). Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Seminars in Immunology*, 21(4):242–253.

Guedes C, Lima J, Helfer E, Veras P & Viallat A (2015). Encapsulation of living *Leishmania* promastigotes in artificial lipid vacuoles. *Plos One*, 10(8):e0134925. (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0134925>).

Gurung P & Kanneganti T-D (2015). Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology*. (<http://doi.wiley.com/10.1111/cmi.12484>).

Joo T, Sowndhararajan K, Hong S, Lee J & Park S (2014). Inhibition of nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells by stem bark of *Ulmus pumila* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5):427–435. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X14000370>).

Kapetanovic R, Bokil NJ & Sweet MJ (2015). Innate immune perturbations, accumulating DAMPs and inflammasome dysregulation: A ticking time bomb in ageing. *Ageing Research Reviews*:1–14. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163715000288>).

Kassim M, Mansor M, Suhaimi A, Ong G & Yusoff K (2012). Gelam honey scavenges peroxynitrite during the immune response. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9):12113–12129.

Kassim M, Mansor M, Kamalden T-A, Shariffuddin I, Hasan M-S, Ong G, Sekaran S-D, Suhaimi A, Al-Abd N & Yusoff, K (2014). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Shock*, 42(2):154–160. (<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-201408000-00012>).

Kawai T & Akira S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5):373–384. (<http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>).

Kaye P & Scott P (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8):604–615. (<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>).

Killick-Kendrick R (1999). The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, 17(3):279–289.

Kim SO, Kundu J-K, Shin Y-K, Park J-H, Cho M-H, Kim T-Y & Surh, Y (2005). [6]-gingerol inhibits COX-2 expression by blocking the activation of p38 MAP kinase and NF-kappa B in phorbol ester-stimulated mouse skin. *Oncogene*, 24(15):2558–2567.

Lee JY, Kim YJ, Kim H J, Yoon S & Park, W (2012). Immunostimulatory effect of laminarin on RAW 264.7 mouse macrophages. *Molecules*, 17(5):5404–5411.

Lee TY, Lee KC, Chen SY & Chang, H (2009). 6-Gingerol inhibits ROS and iNOS through the suppression of PKC- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathways in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(1):134–139. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.160>).

Li G, Zhang J, Guo Q, Wei J, Jiang Y, Zhao X, Zhao L, Liu Z, Lu J & Wan, K (2015). Study of efflux pump gene expression in rifampicin-mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *The Journal of Antibiotics*, (October 2014):1–5. (<http://www.nature.com/doi/10.1038/ja.2015.9>).

Lima-Junior DS, Costa D, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN & Mineo, T (2013). Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nature Medicine*, 19(7):909–15. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23749230>).

Luurtsema G, Windhorst AD, Mooijer MPJ, Herscheid J, Lammertsma A & Franssen, E (2002). Fully automated high yield synthesis of (R)- and (S)-[11C]verapamil for measuring P-glycoprotein function with positron emission tomography. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 45(14):1199–1207.

Martinon F, Burns K & Tschopp J (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . *Molecular Cell*, 10(2):417–426.

Mukherjee T, Mandal D & Bhaduri A (2001). *Leishmania* plasma membrane Mg<sup>2+</sup>-ATPase is a H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-antiporter involved in glucose symport. Studies with sealed ghosts and vesicles of opposite polarity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8):5563–5569.

Natale VAI & Mccullough KC (1998). Macrophage cytoplasmic vesicle pH gradients and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activities relative to virus infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 64:302-310

Nathan C & Ding A (2010). Snapshot: Reactive oxygen intermediates (ROI). *Cell*, 140(6):8–10.

Ordóñez-Gutiérrez L, Martínez M, Rubio-Somoza I, Díaz I, Mendez S & Alunda J. (2009). *Leishmania infantum*: Antiproliferative effect of recombinant plant cystatins on promastigotes and intracellular amastigotes estimated by direct counting and real-time PCR. *Experimental Parasitology*, 123(4):341–346. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.08.015>).

Osorio EJ, Robledo S, Arango G & Muskus, C (2005). *Leishmania*: papel de la glicoproteína P en la mediación de resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. *Biomédica*, 25:242–260.

Ouellette M, Légaré D & Papadopoulou B (2001). Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2):201–206.

Owen J, Punt J, Stranford S & Jones P (2009). *Immunology*, Seventh Ed. United States of America, W. H. Freeman and Company.141-691

Palm NW & Medzhitov R (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227(1):221–233.

Patni S, Flynn P, Wynen L, Seager L, Morgan G, White J & Thornton, C (2007). An introduction to Toll-like receptors and their possible role in the initiation of labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 114(11):1326–1334.

Piddock LJ V (2006). Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8):629–636.

Ponte-Sucre A (2007). Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2):279–286.

Qin H, Wilson C, Lee S, Zhao X & Benveniste, E (2005). LPS induces CD40 gene expression through the activation of NF-kappaB and STAT-1alpha in macrophages and microglia. *Blood*, 106(9):3114–3122.

Rafael-Fernandes M (2014). Caracterização da internalização de fármacos antileishmania e novos compostos por macrófagos parasitados por *Leishmania* spp . *Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, 128pg.

Reybier K, Ribaut C, Coste A, Launay J, Fabre P & Nepveu, F (2010). Characterization of oxidative stress in Leishmaniasis-infected or LPS-stimulated macrophages using electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(12):2566–2572.

Sacks D & Noben-Trauth N (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, 2(11):845–858.

Sahni GS (2012). Visceral leishmaniasis (kala-azar) without splenomegaly. *Indian Pediatrics*, 49(7):590–591.

Santos-Gomes GM & Abranches P (1996). Comparative study of infectivity causes by promastigotes of *Leishmania infantum* MON-1, *L. infantum* MON-24 and *L. donovani* MON-18. *Folia Parasitologica*, 43:7–12.

Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S & Villena, I (2009). The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(2):81–94.

Schaible UE (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological Reviews*, 264:182–203.

Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Harandi M, Nosratabadi J, Parizi M & Barati, M (2012). The effect of verapamil on *in vitro* susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate. *Parasitology Research*, 110(3):1113–1117.

Singh RP, Picado A, Alam S, Hasker E, Singh S, Ostyn B, Chappuis F, Sundar S & Boelaert, M (2012). Post-kala-azar dermal leishmaniasis in visceral leishmaniasis-endemic communities in Bihar, India. *Tropical Medicine and International Health*, 17(11):1345–1348.

Spengler G, Viveiros M, Martins M, Rodrigues L, Martins A, Molnar J, Couto I & Amaral, L (2009). Demonstration of the activity of P-glycoprotein by a semi-automated fluorometric method. *Anticancer Research*, 2178:2173–2177.

Takeda K & Akira S (2003). Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology*, 5(3):143–153.

Tripathi S, Maier K, Bruch D & Kittur D (2007). Effect of 6-Gingerol on pro-inflammatory cytokine production and costimulatory molecule expression in murine peritoneal macrophages. *Journal of Surgical Research*, 138(2):209–213.

Tucsek Z, Radnai B, Racz B, Debreceni B, Priber J, Dolowschiak T, Palkovics T, Gallyas F, Sumegi B & Veres, B (2011). Suppressing LPS-induced early signal transduction in macrophages by a polyphenol degradation product: a critical role of MKP-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1):105–111.

Wells JM, Rossi O, Meijerink M & Baarlen P (2011). Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl :4607–4614.

World Health Organization (2010). Control of the leishmaniases. *World Health Organization technical report series*, (949):22–26.

Yu TW & Anderson D (1997). Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379(2):201–210.