



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA-
PPGIBA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EICOSANOIDES E CITOCINAS EM
PACIENTES INFECTADOS COM *Plasmodium vivax*

PÉRICLES GAMA ABREU FILHO

MANAUS - AMAZONAS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA-
PPGIBA

PÉRICLES GAMA ABREU FILHO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EICOSANOIDES E CITOCINAS EM
PACIENTES INFECTADOS COM *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia, área de concentração: *Imunologia Básica e Aplicada*.

Orientadora: Prof^a Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi

MANAUS - AMAZONAS

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A162c Abreu Filho, Péricles Gama
Caracterização do perfil de eicosanoides e citocinas em pacientes infectados com Plasmodium vivax / Péricles Gama Abreu Filho .
2016
128 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientador: Carlos Arterio Sorgi
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Plasmodium vivax. 2. Eicoisanoides. 3. Citocinas. 4. Pacientes.
I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho aos meus pais
Péricles Gama Abreu e **Maria de Nazaré
Ferreira Abreu**, os quais doaram seu amor,
trabalho e toda sua vida por mim, formaram
meu caráter e me ensinaram que para
conseguirmos o que queremos precisamos
nos dedicar, essa vitória não é somente
minha, é nossa!

AGRADECIMENTOS

Neste momento, após longas orientações, choros, viagens e noites mal dormidas, finalizo mais uma etapa da minha vida. O mestrado em Imunologia era um objetivo alicerçado desde o início da graduação, na época que eu era um aluno de iniciação científica, um sonho que, por muitas vezes, parecia impossível e inalcançável.

Diante dessa conquista agradeço primeiramente a **Deus**, que me deu o dom da vida, e a força necessária para lutar pelos meus objetivos.

Aos meus pais, **Abreu** e **Nazaré** que sacrificaram seus sonhos em favor dos meus, que me ajudaram a superar as minhas decepções e aplaudiram minhas conquistas, `a vocês, exemplos de vida, agradeço a possibilidade de realização deste grande sonho. Amo Vocês!

Às minhas irmãs, **Pryscilla** e **Patrícia** que aguentaram minhas reclamações e os momentos de estresse, muito obrigado meninas.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie**, por me orientar no mestrado, por ter me transmitido uma pequena parte do seu vasto conhecimento em imunologia, pela compreensão e paciência, enfim, por ter contribuído com meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi**, por ter compartilhado seus conhecimentos de mediadores lipídicos para comigo e por ter sido intermédio para que eu pudesse desenvolver parte do meu projeto na USP de Ribeirão Preto.

Aos Doutores **Marcus Vinícius Guimarães Lacerda** e **Wuelton Marcelo Monteiro** por ter confiado e acreditado que eu pudesse desenvolver um projeto com malária.

À **Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli** que disponibilizou seu laboratório para que eu pudesse fazer parte dos meus experimentos.

Aos amigos **Allysson Guimarães da Costa, Andréa Monteiro Tarragô e Nadja Pinto Garcia**, por todo apoio pessoal e profissional nos momentos em que mais precisei. Vocês são maravilhosos.

Às alunas de iniciação científica **Jéssica Santos da Silva e Thainá Cristina Cardoso Costa** pela ajuda nos experimentos realizados em Manaus, sem vocês eu não teria conseguido.

À **MSc. Alyne Fávero Galvão** que teve toda paciência em me ensinar a fazer toda a parte prática e análise de eicosanoides.

Às alunas de doutorado da USP de Ribeirão Preto, **Morgana Kelly Borges Prado e Fabiana Albani Zambuzi** que me ensinaram a analisar estatisticamente os dados da minha dissertação.

Aos amigos de Ribeirão Preto: **Mouzarllem, Verônica, Neto, Jonas, Wanessa, Paulo, Morgana, Karina, Carol, Luma, Luana, Alyne, Jeimison e Atlante**, pessoas essas que em tão pouco tempo se tornaram especiais para mim, muito obrigado pelas palavras de apoio, conselhos e risadas, guardo todos em meu coração!

Aos amigos de Manaus: **Jéssica, Yasmim, Bárbara, Elizeu, Flora, Katherine, Bruna, Thaís, Pedro, Grenda, Priscila, Diana, Hiochelson, Solange, Thaís, Maurício, Hanna, Jéssica Anne, Tayane, e Marquinhos**. Quando eu mais precisava, vocês sempre estavam ali com uma palavra de conforto, muito obrigado pela força, contem sempre comigo!

Aos amigos da **Pós-Graduação em imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA-UFAM)**, conseguimos galera!

Aos meus amigos do **Núcleo de Apoio ao Ensino e Pesquisa NAEP-HEMOAM** pelos momentos de descontração, lanches e risadas.

À todos os docentes do **Programa de Pós-Graduação em imunologia Básica e Aplicada** por todos os ensinamentos e pela excelência do Programa.

À todos os Pacientes da **Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)** e candidatos a doadores de sangue da **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** pela simpatia e doação das amostras, pois sem eles esta pesquisa não teria sido concretizada.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por ceder o laboratório multidisciplinar para eu executar parte do projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** e o **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro concedidos.

À **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** pela oportunidade de cursar o mestrado em Imunologia Básica e Aplicada.

***“Desistir... eu já pensei seriamente
nisso, mas nunca me levei realmente a
sério; é que tem mais chão nos meus
olhos do que o cansaço nas minhas
pernas, mais esperança nos meus
passos, do que tristeza nos meus
ombros, mais estrada no meu coração do
que medo na minha cabeça”.***

Cora Coralina

RESUMO

Introdução: A Malária é uma doença infecciosa causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium*, caracterizada por síndrome febril aguda, gerada pela modulação de citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios derivados de ácido araquidônico que atuam durante a resposta imune contra o parasita. Segundo dados coletados pela OMS, em 2015, ocorreram 214 milhões de casos de malária no mundo, sendo a infecção pelo *P. vivax* responsável por cerca de metade dos casos fora da África, com mais de 2 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco. No Estado do Amazonas estão reunidos mais de 80% dos casos notificados pelo Brasil, dos quais, 90% são pela malária *vivax*. Portanto, este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de eicosanoides, citocinas e quimiocinas circulantes de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* na cidade de Manaus, Amazonas. **Material e Métodos:** Para este estudo foram coletadas amostras de 14 pacientes infectados com *P.vivax* no dia 0 (fase aguda) obtendo apenas 12 retornos no dia 28 (fase de convalescença) e 12 amostras de indivíduos saudáveis. A identificação e a quantificação de lipídeos foram realizadas pela técnica de lipidoma (HPLC/MS) e a dosagens de citocinas e quimiocinas por citometria de fluxo, usando o kit de dosagem de citocinas CBA. As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPadPrism5.0*. **Resultados:** Os resultados demonstraram um aumento significativo nos leucócitos totais, eosinófilos, basófilos, linfócitos, plaquetas, colesterol total e HDL e uma diminuição significativa na glicose, GGT, bilirrubinas totais, direta e indireta no D0 quando comparado ao D28. De 23 eicosanoides pesquisados, 10 foram encontrados e descritos neste trabalho (LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTE₄, PGE₂, 15-keto-PGE₂, TXB₂, 5-Oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE e 15-HETE). No entanto, observou-se que estes estavam com as concentrações reduzidas no D0, quando comparados com grupo controle. Contudo, LTB₄, 6-trans-LTB₄, 5-Oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE apresentaram-se aumentados quando comparamos D0 com D28. Além disso, as concentrações de IL-6, IL-10, IFN-γ, IL-17A, IL-8, MIG, MCP-1 e IP-10 se mostraram elevadas no D0 em comparação com o grupo controle, exceto RANTES. Quando comparamos D0 com o D28 observou-se uma diminuição desses mediadores solúveis, exceto RANTES. Por fim, foi demonstrado que as citocinas IL-6 e IFN-γ e as quimiocinas IL-8, RANTES MIG, MCP-1 e IP-10 apresentaram correlação com todos os eicosanoides identificados. **Conclusão:** Pode-se concluir que pacientes com malária *vivax* podem apresentar alterações hematológicas significativas sem desenvolverem a forma grave da doença. Além disso, observou-se a produção de eicosanoides na malária sugerindo a participação do mesmo durante a resposta imunológica do hospedeiro a partir das interações obtidas entre as citocinas inflamatórias e quimiocinas.

Palavras-Chaves: *Plasmodium vivax*; Eicosanoides; Citocinas.

ABSTRACT

Introduction: Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, characterized by acute febrile syndrome, generated by modulation of cytokines, chemokines and inflammatory mediators derived from arachidonic acid that act during the immune response against the parasite. According to data collected by the WHO in 2015, there were 214 million cases of malaria worldwide, and infection with *P. vivax* accounts for about half of the cases outside Africa, with more than 2 billion people living in risk areas. In the State of Amazonas are meeting more than 80% of cases reported by Brazil, of which 90% are for vivax malaria. Therefore, this study aimed to characterize the eicosanoid profile, cytokines and chemokines current patients infected with *Plasmodium vivax* in Manaus, Amazonas. **Material and Methods:** For this study, samples were collected from 14 patients infected with *P. vivax* on day 0 (acute phase) getting only 12 returns on day 28 (convalescent phase) and 12 samples from healthy individuals. The identification and quantification were performed by lipid lipidome technique (HPLC / MS), and the dosages of cytokines and chemokines by flow cytometry using the CBA cytokine kit dosage. Statistical analyzes were performed with the GraphPadPrism5.0 program. **Results:** The results demonstrated a significant increase in the total leukocytes, eosinophils, basophils, lymphocytes, platelets, total and HDL cholesterol and a significant decrease in glucose, GGT, total direct and indirect bilirubin in D0 when compared to eicosanoids searched in D28. Within 23 eicosanoid surveyed 10 were found and described in this paper (LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTE₄, PGE₂, 15-keto-PGE₂, TXB₂, 5-oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE and 15-HETE). However, it was observed that with these concentrations were reduced on D0 when compared with the control group. However, LTB₄, 6-trans-LTB₄, 5-oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE was presented increase when compared D0 with D28. In addition, the IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A, IL-8, MIG, MCP-1 and IP-10 concentrations were high in D0 compared with the control group, except RANTES. When comparing D0 to D28 there was a decrease of these soluble mediators, except RANTES. Finally, it was shown that IL-6 and IFN- γ cytokines and IL-8, RANTES MIG, MCP-1 and IP-10 chemokines were correlated to the all identified eicosanoids. **Conclusion:** It can be concluded that patients with vivax malaria can present significant hematologic changes without developing the severe form of the disease. Moreover, it observed the production of eicosanoids malaria suggesting the participation thereof during the host immune response obtained from interactions between inflammatory cytokines and chemokines.

Key Words: *Plasmodium vivax*; eicosanoids; Cytokines.

LISTA DE FIGURA

Figura 1: Mapa das mudanças das taxas de incidência na infecção por malária no período de 2000 – 2015	23
Figura 2: Mapa de risco da malária no continente Americano.....	24
Figura 3: Áreas de transmissão da Malária no Amazonas no ano de 2010	25
Figura 4: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	26
Figura 5: Alguns dos mecanismos envolvidos na resposta imune inata, ligados ao parasita por células fagocíticas.	30
Figura 6: Biossíntese dos eicosanoides	34
Figura 7: Mapa com a localização da cidade de Manaus-Amazonas-Brasil	41
Figura 8: Estrutura química dos eicosanoides analisados neste trabalho (As estruturas foram desenhadas no programa chemdraw).....	51
Figura 9: Concentrações séricas de LTB ₄ , 6-trans-LTB ₄ e LTE, em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o <i>Plasmodium vivax</i> após a estimulação <i>in-vitro</i>	59
Figura 10: Concentrações séricas de PGE ₂ , 15-keto-PGE ₂ e TXB ₂ , em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o <i>Plasmodium vivax</i> após a estimulação <i>in-vitro</i>	60
Figura 11: Concentrações séricas de 5-HETE, 5-Oxo-EET, 12-HETE e 15HETE em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o <i>Plasmodium vivax</i> após a estimulação <i>in-vitro</i>	61
Figura 12: Concentrações séricas de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o <i>Plasmodium vivax</i>	63
Figura 13: Concentrações séricas de quimiocinas em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o <i>Plasmodium vivax</i>	64
Figura 14: Diagrama de altos e baixos produtores de eicosanoides em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i> estimulados <i>in-vitro</i>	67

Figura 15: Representação em radar referente ao diagrama de altos e baixos produtores de eicosanoides em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i> estimulados <i>in-vitro</i>	68
Figura 16: Diagrama de altos e baixos produtores de citocinas em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>	69
Figura 17: Representação em radar referente ao diagrama de altos e baixos produtores de citocinas em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com <i>Plasmodium-vivax</i> estimulados <i>in-vitro</i>	70
Figura 18: Rede de interação entre eicosanoides, citocinas e quimiocinas em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com <i>Plasmodium vivax</i>	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gradiente de eluição dos mediadores lipídicos	49
Tabela 2: Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas dos pacientes com malária-vivax e grupo controle.....	55
Tabela 3: Dados Laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) dos pacientes com malária no D0, D28 e grupo controle.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AA Ácido Araquidônico

AGE Ácidos Graxos Essenciais

AMPc Adenosina Monofosfato Cíclico

CBA “Cytometric Bead Array”

CD “Cluster Differentiation”

CHCM Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COXs Cicloxigenases

cPLA₂ Fosfolipase A₂Citosólica

CYP 450 Citocromo P450

CysLTs Cys-Leucotrienos

D0 Dia zero (0)

D28 Dia Vinte e Oito (28)

DC Célula Dendrítica

DHETEs Ácidos Dihidroxeicosatrienólicos

DNA Ácido Desoxirribonucléico

EETs Epoxieicosatrienólicos

EM Espectrometria de Massas

EPA Ácido Eicosapentaenoico

fl Fentolitros

FLAP Proteína Ativadora da Enzima 5-Lipoxigenase

FMT-HVD Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Doutor Heitor Vieira Dourado

GPCRs Receptores Associados à Proteína G

GPI Glicosilfosfatidilinositol

HCM Hemoglobina Corpuscular Média

HEMOAM Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

HDL Proteína de Alta Densidade

HETEs Hidroxieicostetraenólicos

HPLC “High Performance Liquid Chromatography”

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC A23187 Ionóforo de Cálcio A23187

IFN- γ Interferon-gama

Ig Imunoglobulina

IL Interleucina

IPA Índice Parasitário Anual

LA Ácido Linolênico

LDL Proteína de Baixa Densidade

LOXs Lipoxigenases

LTs Leucotrienos

LXs Lipoxinas

MCP “Monocyte Chemoattractant Protein”

MFI Intensidade Média de Florescência

mg/dL Miligramas por Decilitro

MIP “Macrophage Inflammatory Protein”

MHC Molécula de Histocompatibilidade

mL Mililitro

mm Milímetro

MRM Monitoração de Reações Múltiplas

MS “Mass Spectrometry”

ng Nanogramas

NK Natural killer

OMS Organização Mundial de Saúde

P. falciparum *Plasmodium falciparum*

P. knolesi *Plasmodium knowlesi*

P. malarie *Plasmodium malarie*

P. ovale *Plasmodium ovale*

P. vivax *Plasmodium vivax*

PAMP Padrão Molecular Associado à Patógeno

PfEMP “P. falciparum-encoded Erythrocyte Membrane Protein”

pg Picogramas

PGs Prostaglandinas

PGI₂ Prostaciclina I2

NO Oxido Nítrico

RDW “Red Distribution Width”

TCLE Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TGF Fator de Crescimento Transformador

TGO Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP Transaminase Glutâmico-Piruvica

TNF Fator de Necrose Tumoral

TLR “Toll Like Receptors”

Treg Célula T Reguladora

TX Tromboxano

U/l Unidades por litro

VCM Volume Corpuscular Médio

VLDL Proteína de Muito Baixa Densidade

VPM Volume Plaquetário Médio

μL Microlitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Epidemiologia da Malária	23
2.2 Ciclo Parasitário	25
2.3 Diagnóstico e Tratamento da Malária.....	26
2.4 Resposta Imunológica a Malária.....	27
2.4.1 Resposta Imune Inata Contra a Malária	28
2.4.2 Resposta Imune Adaptativa Contra a Malária	31
2.5 Metabolismo para a Produção de Mediadores Lipídicos	33
2.6 Detecção de Eicosanoides	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Tipo de Estudo	41
4.2 População de Estudo: Manaus – AM.....	41
4.3 Amostragem: Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM)	42
4.4 Critérios de Inclusão.....	42
4.5 Critérios de Exclusão	42
4.6 Aspectos Éticos	42

4.7 Fluxograma do Projeto	44
4.8 Coleta de Dados e Material Biológico	45
4.9 Testes Hematológicos	45
4.10 Dosagem de Citocinas Plasmáticas por Citometria de Fluxo, usando kit CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>)	46
4.11 Testes Bioquímicos- Lipidograma, Dosagens Hepáticas e Renais	46
4.12 Identificação e Quantificação de Eicosanoides	47
4.12.1 Estimulação da formação de Eicosanoides a Partir do Sangue Total Periférico.....	47
4.12.2 Desnaturação de proteínas e Purificação de Lipídeos de Amostras de Plasma Humano	47
4.12.3 Análises Qualitativa e Quantitativa de Eicosanoides por HPLC-MS/MS (Lipidoma).....	48
4.13 Análises Estatísticas Convencionais	52
4.14 Análises Estatísticas não Convencionais.....	52
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Dados Demográficos e Características Clínico-Epidemiológicas	54
5.2 O papel dos Mediadores Lipídicos (Eicosanoides) nos Pacientes com Malária-vivax	57
5.2.1 Perfil de Leucotrienos	57
5.2.2 Perfil de Prostaglandinas e Tromboxanos	57
5.2.3 Perfil de HETES.....	58
5.3 Concentrações das Citocinas Séricas nos Pacientes com Malária.....	62
5.3.1 Citocinas do Perfil Th1, Th2 e Th17.....	62
5.3.2 Perfil de Quimiocinas	62

5.4	Análise de Altos Produtores de Citocinas, Quimiocinas e Eicosanoides	65
5.5	Rede de Interações entre os Mediadores Inflamatórios	71
6	DISCUSSÃO	75
6.1	Características clinico-epidemiológicas e laboratoriais	75
6.2	Perfil de Citocinas	77
6.3	Perfil de Quimiocinas	78
6.4	Perfil de Eicosanoides	80
6.5	Correlações dos Mediadores Solúveis	85
	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICES	120
	Apêndice 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-FMT-HVD	120
	Apêndice 02: TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	124
	Apêndice 03: Questionário Estruturado	127

*Introdução e
Revisão Bibliográfica*

INTRODUÇÃO

A malária é um grave problema de saúde pública devido a sua alta incidência e as consequências (morbidade) que trazem para pessoas acometidas pela doença. Esta doença influencia significativamente o potencial de desenvolvimento de países, regiões e estados, pelos múltiplos custos que ela provoca (BUTCHER, 2004).

A malária é endêmica principalmente nas áreas tropicais e subtropicais do mundo e, mesmo nessas regiões, sua distribuição não é homogênea. Ocorre principalmente na África, no Sudeste Asiático e na Região Amazônica da América do Sul. Sua incidência maior é no continente africano, ao sul do deserto do Saara, onde ocorrem 80% do total de casos e mortes por malária no mundo, principalmente entre crianças e jovens (TAUIL, 2006).

No Brasil, a doença é predominantemente encontrada na Amazônia Legal, que compreende os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Prevalendo nestas regiões, as infecções pelo *Plasmodium vivax* e pelo *Plasmodium falciparum*, principalmente em populações vivendo em condições precárias de habitação e trabalho (SILVEIRA E REZENDE, 2001).

Esta infecção parasitária (malária) é uma doença curável, se prontamente diagnosticada e adequadamente tratada, é causada por protozoários de filo *Apicomplexa*, gênero *Plasmodium*, sendo as espécies *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, transmitidas pelos mosquitos do gênero *Anopheles* (LANGHORNE *et al.*, 2008; OLIVEIRA-FILHO E MARTINELLI, 2009; DA SILVA SANTOS *et al.*, 2012). Contudo, o *P. ovale* e *P. knowlesi* ainda não foram descritos no Brasil (OMS, 2013).

Das espécies citadas, o *P. falciparum* ocasiona a maior parte das formas graves e letais da doença, e o *P. vivax* que apesar de ser considerado responsável pela maior

morbidade no mundo foi descrito como o agente etiológico de uma infecção benigna (PRICE *et al.*, 2007).

Em todo o mundo, a maioria das infecções por *Plasmodium* é clinicamente silenciosa, refletindo a habilidade dos mecanismos imunológicos adaptativos em prevenir os sintomas (GREENWOOD *et al.*, 2005). Em indivíduos não imunes, as infecções são clinicamente mais evidentes, e uma minoria de casos pode se tornar grave, com acometimento de múltiplos órgãos e causar a morte. As manifestações clínicas da doença dependem da espécie do *Plasmodium*, da idade e da imunidade antimalárica do hospedeiro (DRUILHE E PÉRIGNON, 1997; 1998).

Diversas são as explicações possíveis para a incapacidade do organismo em desenvolver uma resposta imune efetora, como normalmente ocorre em infecções virais e bacterianas. Os complexos mecanismos de escape do *Plasmodium* podem responder algumas questões, mas necessitam de melhor elucidação (HISAEDA *et al.*, 2005).

O *Plasmodium* é um parasita intracelular, sendo capaz de suprimir a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II) e dificultar a resposta celular citotóxica (HISAEDA *et al.*, 2005). O parasita também induz modificação da superfície de hemácias, facilitando a aderência ao endotélio vascular e dificultando a eliminação de parasitas pelo sistema retículo-endotelial. Além disso, a diversidade de antígenos entre as várias formas evolutivas do parasita, o polimorfismo antigênico entre as cepas e a variação antigênica clonal de uma mesma cepa tornam as respostas imunes específicas menos eficazes (HISAEDA *et al.*, 2004).

Segundo dados publicados por nosso grupo de pesquisa, em pacientes infectados por *P.vivax* na cidade de Coari-Amazonas, foram identificados biomarcadores inflamatórios (IL-6, CXCL-8, IFN- γ , IL-5), e regulatórios (IL-10). Este estudo sugeriu um padrão misto na resposta imunológica do hospedeiro, e que as concentrações de IL-6 e IL-10 podem não estar associadas com o número de episódios da doença, e sim, com a carga parasitária (GUIMARÃES DA COSTA *et al.*, 2014). Outros fatores solúveis

envolvidos na ativação/modulação da resposta imunológica necessitam serem investigados, como a presença de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos.

Dentre os mediadores lipídicos inflamatórios negligenciados na resposta imune à malária, estão os eicosanoides, que desempenham um papel importante nos processos inflamatórios e na interface com a imunidade humoral.

Assim, a caracterização dos perfis de citocinas e eicosanoides são ferramentas importantes que podem contribuir para a melhor compreensão da resposta imune ao *P. vivax*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Epidemiologia da Malária

Segundo dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) houve uma redução de 18% no número de casos notificados com malária nos últimos quinze anos, com redução de 48% da taxa de mortalidade da doença no mundo. Acredita-se que a maioria dos casos em 2015 ocorreram no continente Africano (88%), região sudeste da Ásia (10%) e na região do Mediterrâneo Oriental (2%) (OMS, 2015) (**Figura 1**).

Estima-se que desse total de infecções no ano de 2015, 13,8 milhões de casos foram causados por *P. vivax*. Destes, estima-se que metade dos casos ocorreram fora da África. Os casos graves e mortes devido a esta espécie têm sido relatados em todas as regiões endêmicas estabelecendo aproximadamente 16% das mortes (OMS, 2015).

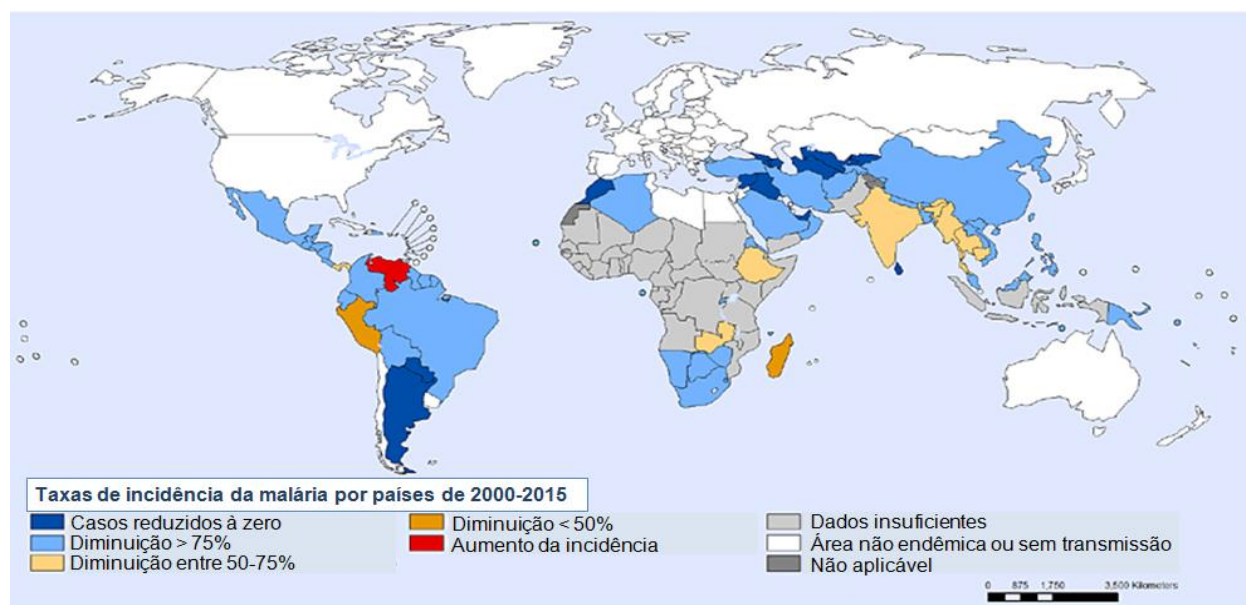


Figura 1: Mapa das mudanças das taxas de incidência na infecção por malária no período de 2000 – 2015

Fonte: OMS, 2015 - Modificado por Filho, PGA

No continente americano, foram confirmados 390.000 casos de malária no ano 2014. As áreas mais afetadas são os estados de Bolívar (Venezuela), Amazonas (Brasil) e a Guiana onde mais de 70% das ocorrências estão associadas ao *P. vivax*, embora *P. falciparum* seja responsável em mais de 50% dos casos na Guiana e Guiana Francesa e 100% na República Dominicana em Haiti. Ainda, em 2014 foram reportadas 79 mortes, sendo o Brasil detentor de metades dos óbitos (OMS, 2015) (**Figura 2**).

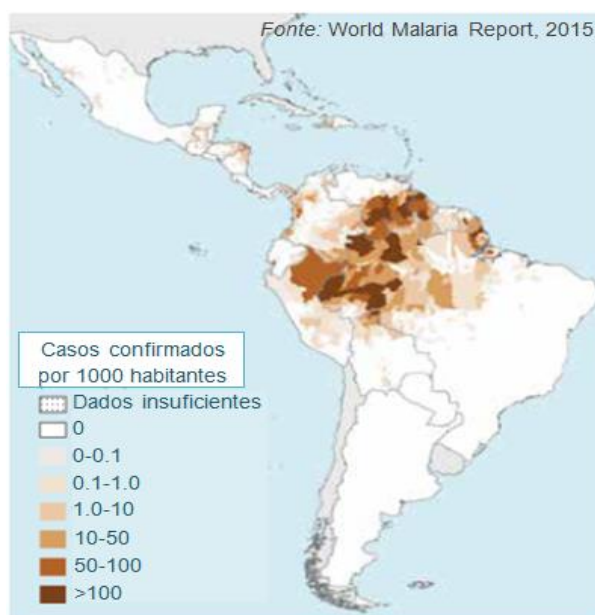


Figura 2: Mapa de risco da malária no continente Americano

Fonte: OMS, 2015 - Modificado por Filho, PGA

O estado do Amazonas é considerado uma área com alta endemia para a doença, tendo média de infecção, segundo o Índice Parasitário Anual (IPA) de 42,2/1.000 habitantes nos últimos 10 anos (SUÁREZ-MUTIS *et al.*, 2007). Em 2010, 15 municípios (Atalaia do Norte, Barcelos, Borba, Coari, Eirunepé, Guajará, Itacoatiara, Lábrea, Manaus, Manicoré, Rio Preto da Eva, São Gabriel da Cachoeira, Tabatinga, Tapauá e Tefé) colaboraram com mais de 80% dos casos de malária no Estado do Amazonas, (Brasil, 2011) (**Figura 3**). De janeiro de 2015 até maio de 2016, aproximadamente 100 mil casos foram registrados, dos quais, 90% são causados por *P. vivax* (SINVEP, 2016).

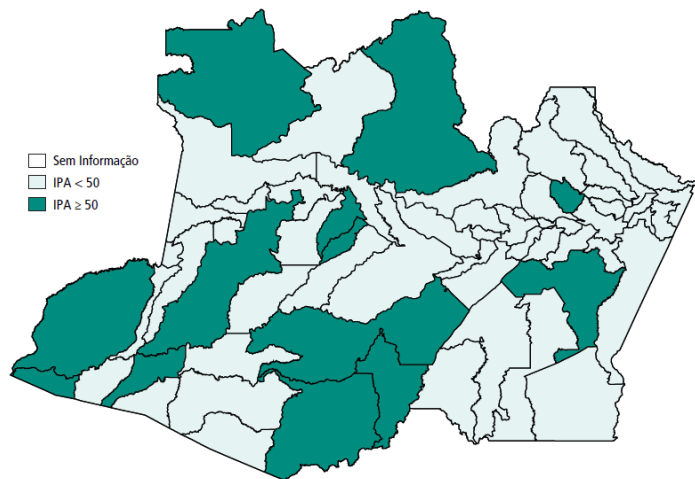


Figura 3: Áreas de transmissão da Malária no Amazonas no ano de 2010
Fonte: BRASIL, 2011

2.2 Ciclo Parasitário

Os parasitas que causam a malária desenvolvem ciclo biológico similar, que se alterna entre o hospedeiro humano e o mosquito anofelino (**Figura 4**). No homem esse ciclo segue algumas fases como: 1) Inoculação de esporozoítos pelo mosquito; 2) Migração dos parasitas para circulação sanguínea e em seguida para o fígado; 3) Invasão dos hepatócitos no órgão e reprodução na forma assexuada, originando os esquizontes teciduais que amadurecem e liberam milhares de merozoítos; 4) Liberação na corrente sanguínea de merozoítos e invasão das hemácias, iniciando nova esquizogonia; 5) Transformação em trofozoítos, que amadurecem e se dividem, gerando esquizontes no qual rompem as hemácias e são liberados novamente na corrente sanguínea na forma de merozoítos; 7) Invasão de novas hemácias e/ou diferenciação em gametócitos machos ou fêmeas (MILLER *et al.*, 2002).

Já no mosquito seguem as seguintes fases: 1) Ingestão dos gametócitos através repasto sanguíneo, 2) Migração dos gametócitos para luz do intestino do inseto onde ocorre a reprodução sexuada ou fecundação, dando origem a um zigoto que se transformará em oocineto, 3) Ruptura do epitélio do intestino e transformação destes

em oocisto e por último 4) Início da esporogonia dando origem ao esporozoítos, que irá migrar para as glândulas salivares do mosquito, gerando assim um novo ciclo quando inoculados através de um novo repasto sanguíneo (MATUSCHEWSKI, 2006).

Entretanto, para as espécies *P. vivax* e *P. ovale* os esporozoítos presentes no homem podem permanecer quiescentes nas células do fígado por um longo período de tempo, transformando-se em hipnozoítas (STURM *et al.*, 2006).

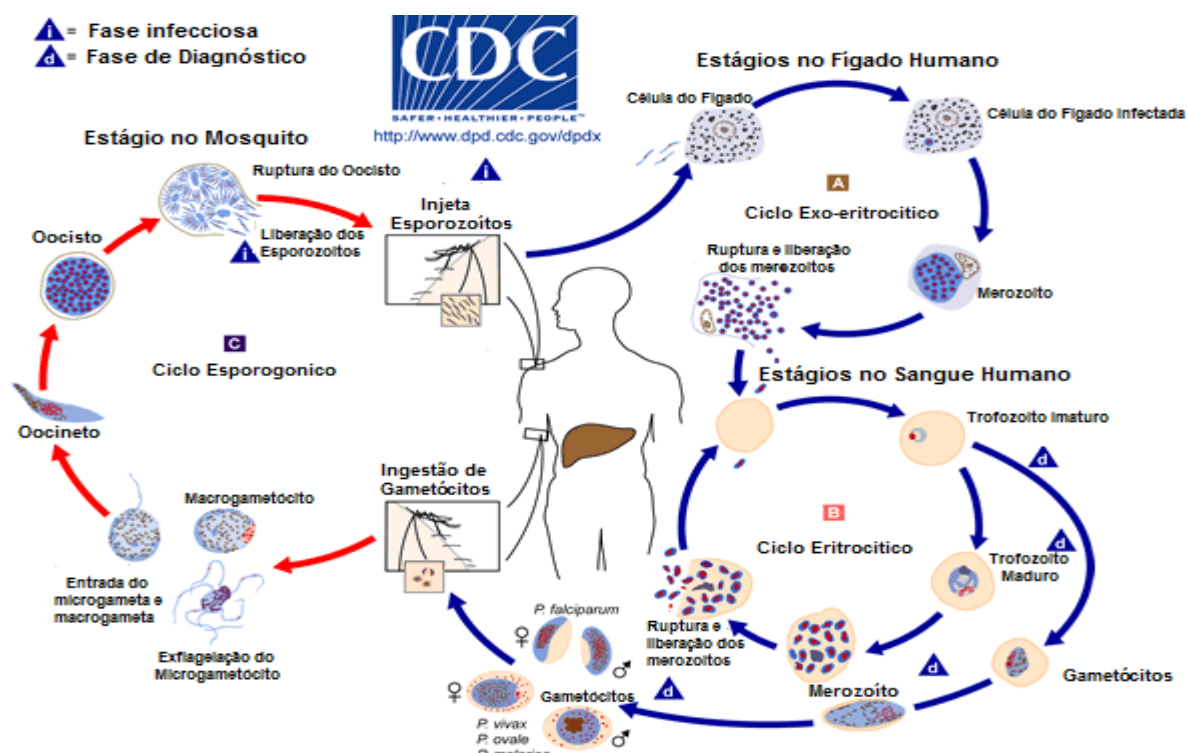


Figura 4: Ciclo de vida do *Plasmodium*

Fonte: CDC, 2016 – Modificado por Filho, PGA

2.3 Diagnóstico e Tratamento da Malária

Nos vários lugares onde a malária é endêmica, predominando os países pobres ou em desenvolvimento, o diagnóstico da infecção ainda precisa de melhorias para melhor atender os indivíduos que pertencem a esses países. Apesar de todos os avanços tecnológicos adquiridos, o método de visualização microscópica a partir do estendido sanguíneo (gota espessa) no qual pode ser observado o parasita ainda é considerado o

padrão ouro para as áreas endêmicas (COLEMAN *et al.*, 2002; BOWERS *et al.*, 2009; ALEXANDER *et al.*, 2010).

O tratamento para malária é direcionado ao combate do parasita em seu ciclo evolutivo. Os medicamentos atuam na interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; na destruição das formas latentes das espécies *P. vivax* e *P. ovale* no ciclo tecidual (hipnozoítos), evitando assim sua ativação tardia; na interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de suas formas sexuadas (gametócitos). O ministério da saúde criou diversos esquemas terapêuticos designados para cada espécie, utilizando fármacos como a primaquina, cloroquina, mefloquina, artesunato, quinina e doxiciclina (BRASIL, 2010).

2.4 Resposta Imunológica a Malária

O ser humano (hospedeiro) é capaz de desenvolver uma resposta imunológica contra as diversas formas e estágios do *Plasmodium* (GOOD *et al.*, 2005). Isso tem sido relatado em modelos experimentais que puderam observar que os componentes imunológicos foram eficientes para controlar a reprodução do parasita na fase sanguínea da doença (STEVENSON E RILEY, 2004).

No entanto, existem uma gama de fatores que podem está influenciando na eficiência da resposta imune e no prognóstico da doença, como a intensidade de transmissão, fatores econômicos e sociais e virulência do parasita (SNOW *et al.*, 2001).

Inúmeras evidências indicam que podemos possuir uma resposta imune protetora natural contra a malária, podendo ser obtidas a partir de consecutivas infecções (COHEN E BUTCHER, 1961; MCGREGOR, 1974; BAIRD *et al.*, 1991). Porém, essa imunidade é parcialmente cepa-específica (WEBSTER E HILL, 2003).

Em regiões onde a malária é endêmica, uma grande parte das infecções causada pelo *Plasmodium* é silenciosa, indicando que indivíduos residentes nestas áreas possuem a habilidade de manter os mecanismos da imunidade inata ativados por

longos períodos de tempo ou desenvolver uma resposta imune adaptativa efetora, controlando assim o parasita. Por outro lado, o parasita utiliza dessa adaptação do hospedeiro, para criar mecanismos de escape que favorece sua transmissão a outros vetores que irão manter o seu ciclo evolutivo (ALVES *et al.*, 2005).

Assim, fica claro que as repostas imunes inata e adaptativa são essenciais para controlar a infecção e requer a participação de moléculas do sistema complemento, ativação de macrófagos, células NK e NKT, células dendríticas (DC), linfócitos TCD4+, TCD8+ e a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (URBAN *et al.*, 1999; ENGWERDA E GOOD, 2005; ROLAND *et al.*, 2006; DIALLO *et al.*, 2008; COELHO-CASTELO *et al.*, 2009)

2.4.1 Resposta Imune Inata Contra a Malária

Estudos têm sido realizados para entendermos cada vez mais como funciona a resposta imune inata do hospedeiro ao parasita. O desenvolvimento desta resposta está diretamente associado com a ativação da resposta imune adaptativa. Os receptores do tipo Toll (TLR) pertencem ao um grupo de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), cujo papel fundamental é participar do início da resposta imune inata (MEDZHITOV E JANEWAY, 2000; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005).

O *Plasmodium* possui moléculas de glicosilFosfatidilInositol (GPI), que ativa macrófagos através da interação com os receptores TLR-2 e TLR-4 fazendo com que ocorra um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-12) e óxido nítrico (NO) (ZHU *et al.*, 2005; KRISHNEGOWDA *et al.*, 2005).

Durante a infecção na fase eritrocítica, o parasita digere a hemoglobina presente na hemácia, levando a formação de resíduos altamente tóxicos denominados heme. A fim de evitar um dano oxidativo causado por estes resíduos, o parasita desenvolveu um mecanismo que converte o heme em um cristal insolúvel, denominado hemozoina (FRANCIS *et al.*, 1997). A hemozoina liga-se ao DNA do parasita e pode ser

reconhecida por Toll-9, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e até mesmo a produção de quimiocinas como MCP-1, MIP-1 α e β e IL-8, aumentando assim a resposta inflamatória (PARROCHE *et al.*, 2007; GIRIBALDI *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Franklin *et al.*, (2011), demonstrou que através do bloqueio de TLR -9 ocorreu a diminuição dessas citocinas, indicando que esse receptor é importante na sinalização para a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Dentre os componentes que participam da resposta imune inata se encontram as células T $\gamma\delta$, NK, NKT, células dendríticas e os macrófagos. As células NK estão presentes na medula óssea, sangue periférico e baço e essa grande distribuição permite que essas células tenham maior probabilidade de contato com eritrócitos parasitados. Na resposta imune inata, as células NK produzem IFN- γ e são capazes de eliminar o parasita devido aos processos de citotoxicidade em resposta ao parasita (OJO-AMAIZE *et al.*, 1984; DOOLAN E HOFFMAN, 1999; ARTAVANIS-TSAKONAS E RILEY, 2002).

As células NKT e as Células T $\gamma\delta$ irão contribuir para imunidade antimalárica, realizando um papel essencial no desenvolvimento das respostas imunes inata e adaptativa (STEVENSON E RILEY, 2004). No entanto, as células NKT participam contra o desenvolvimento das formas pré-eritrocíticas em hepatócitos (SCHMIEG *et al.*, 2003), já as células T $\gamma\delta$ são encontradas em grande número nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, desencadeando a produção de IFN- γ e possuindo funções antiparasitárias (ELLOSO *et al.*, 1994; LANGGORNE *et al.*, 1994; HENSMANN *et al.*, 2001).

Durante a infecção pelo *Plasmodium*, os monócitos possuem a função de fagocitar eritrócitos infectados na ausência de anticorpos específicos opsonizantes, havendo uma interação do receptor CD36 presente em monócitos com a proteína PfEMP-1 (*P. falciparum*-encoded erythrocyte membrane protein 1) (SERGHIDES *et al.*, 2003).

A fagocitose dependente de anticorpo pode acontecer, e este processo se inicia quando os merozoítos liberados na corrente sanguínea são identificados por anticorpos específicos do tipo IgG1 e IgG3, que posteriormente se ligam ao receptor de monócito (FcγRs) (DASARI *et al.*, 2012).

As células dendríticas iniciam a resposta imune adaptativa, apresentando peptídeos do parasita aos linfócitos T (URBAN *et al.*, 1999; DIALLO *et al.*, 2008). Outro componente da resposta imune inata são as moléculas do sistema complemento, que são capazes de causar a lise direta ao parasita (ENGWERDA E GOOD, 2005). Outro mecanismo responsável por ativar complemento é iniciado quando as hemácias infectadas se rompem liberando restos celulares e componentes de membrana, gerando a deposição de C3b e dando início ao processo de fagocitose celular (SILVER *et al.*, 2010; COUPER *et al.*, 2011). Alguns dos mecanismos que foram citados acima estão descritos na **Figura 5**.

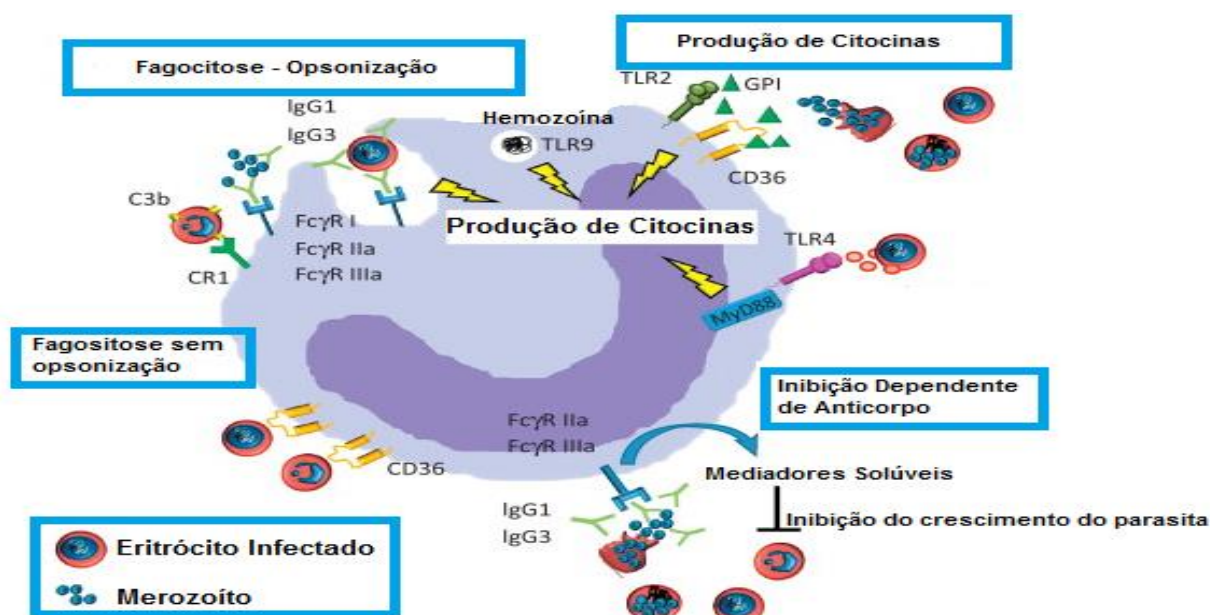


Figura 5: Alguns dos mecanismos envolvidos na resposta imune inata, ligados ao parasita por células fagocíticas.

Fonte: CHUA *et al.*, 2013 - Modificado por Filho, PGA

2.4.2 Resposta Imune Adaptativa Contra a Malária

A ativação da resposta imune adaptativa ocorre através de diversos fatores um deles está relacionado com a fase sanguínea, estando associada com a produção de anticorpos, visto que a hemácia não apresenta moléculas de histocompatibilidade (MHC), importantes para a apresentação de antígenos aos linfócitos T. No entanto, parasitas livres são fagocitados pelas células apresentadoras de antígenos, e assim iniciar a uma resposta imune celular mediada por linfócitos T CD4⁺, responsáveis pela produção de algumas citocinas (NDUNGU *et al.*, 2005).

A resposta imunológica contra as formas eritrocíticas é de grande relevância, pois é nesta fase que o *Plasmodium* apresenta os sintomas clínicos da doença. Esta resposta é preponderantemente dependente dos mecanismos da imunidade humoral, embora outros mecanismos protetores já tenham sido relatados, abrangendo a imunidade inata, produção de citocinas e a proliferação de células T (PLEBANSKI E HILL, 2000; GARRAUD *et al.*, 2003; MOORTHY *et al.*, 2004; LANGHORNE *et al.*, 2008).

As células T CD4⁺ participam na indução da resposta imunológica contra as formas sanguíneas, durante a infecção, ao mesmo tempo em que as células T CD8⁺ estão envolvidas nos mecanismos de citotoxicidade contra os estágios hepáticos do parasita (TORRE *et al.*, 2002). No processo de regulação dessa resposta, as citocinas podem inibir a proliferação e a ativação dos linfócitos e induzir os linfócitos T reguladores (PERRY *et al.*, 2004; NDUNGU *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Arevalo-Herrera *et al.*, (2002), identificou em humanos, a participação das moléculas de MHC de classe I na apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8⁺ durante a fase hepática na infecção por *P. vivax*. A ativação de Linfócitos T CD8⁺ por essas moléculas, foram responsáveis por promoverem o rompimento de hepatócitos infectados (GONZALEZ *et al.*, 2000; JOBE *et al.*, 2009).

A resposta imune celular inicial é caracterizada pela ativação dos linfócitos T CD4⁺ do perfil Th1, juntamente com a produção de IFN- γ e TNF- β , ocorrendo o controle da

densidade parasitária no hospedeiro realizado a partir da ativação dos macrófagos e da produção sinérgica de IL-2, TNF- α IFN- γ e NO (ROCKET *et al.*, 1991; JACOBS *et al.*, 1996). Porém, quanto a eliminação dos parasitas, este processo é definido pela presença de linfócitos T CD4⁺ de perfil Th2, incluindo as citocinas IL-4, IL-5 e IL-6, junto com a ativação de células T $\gamma\delta$ e células NK produtoras de IFN- γ (ARTAVANIS-TSAKONAS E RILEY, 2002; ARTAVANIS-TSAKONAS *et al.*, 2003; MACKINTOSH *et al.*, 2004; BOUTLIS *et al.*, 2006). Outro fator característico da resposta imune adaptativa é a formação de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória, podendo atuar durante a fase de defesa primária quando esse hospedeiro se infectar novamente (KEATING *et al.*, 2005).

Vários tipos de células T CD4⁺ se desenvolvem a partir de células T virgens quando submetidas aos antígenos, sendo caracterizadas pela síntese de citocinas e mecanismos efetores (BETTELLI *et al.*, 2007). Um desses tipos é o perfil Th17 no qual ocorre a produção de IL-17, que, por sua vez, terá a função de recrutar neutrófilos para o local da inflamação, induzir a produção de quimiocinas e peptídeos antimicrobicidas pelos tecidos celulares (ACOSTA-RODRIGUEZ *et al.*, 2007; IWAKURA *et al.*, 2008).

Em um estudo murino foi identificado o receptor ROR γ t, que funciona como chave da orquestração da diferenciação de células Th17, sendo essa resposta induzida pela produção de citocinas do tipo IL-6 e TGF- β (YANG *et al.*, 2007).

Um estudo desenvolvido por Ishida *et al.*, (2010) demonstrou que camundongos deficientes para IL-17 também desenvolveram malária cerebral induzida por *P. berghei*, indicando que essa citocina talvez não esteja envolvida na patogênese da malária cerebral.

A fim de tentar controlar a resposta imunológica, ocorre a ativação de células T regulatórias (Tregs), que fazem parte de uma subpopulação de células especializadas na supressão imunológica, mas em alguns casos, pode desenvolver um controle regulador excessivo, o que permite a replicação do parasita sem restrição comprometendo assim o hospedeiro (SAKAGUCHI, 2000; ADALID-PERALTA *et al.*, 2011). Essas células limitam a amplitude da resposta imunológica celular, devido à

produção de fatores solúveis, tais como, TGF- β , IL-10 e IL-35, podendo resultar na incapacidade de controlar adequadamente a infecção (BELKAID E TARBELL, 2009; BUENO *et al.*, 2010; SEHRAWAT E ROUSE, 2011).

A indução de células Tregs durante a malária pode ser dependente da citocina IL-10 e TGF- β (WU *et al.*, 2007). E sua função tem sido relacionada com o controle das respostas inflamatórias e na diminuição da densidade parasitária, no entanto, o aumento no número dessas células tem criado uma ação oposta, ocasionando o aumento da concentração de parasitas e conseqüentemente o desenvolvimento da infecção (WALTHER *et al.*, 2005; TODRYSK *et al.*, 2008; MINIGO *et al.*, 2009).

As células Tregs na malária atuam na supressão não somente de células T, mas também em diferentes tipos de células da imunidade, tais como, células T CD4⁺ CD25⁻, T CD8⁺, linfócitos B, natural killer (NK), monócitos, DCs e neutrófilos (JANSSENS *et al.*, 2003; MISRA *et al.*, 2004; TRZONKOWSKI *et al.*, 2004; TAAMS *et al.*, 2005; LEWKOWICZ *et al.*, 2006; VENET *et al.*, 2006).

2.5 Metabolismo para a Produção de Mediadores Lipídicos

Muitas pesquisas relatam que a distribuição dos ácidos graxos essenciais (AGE) no plasma é modulada pela alimentação diária do indivíduo e essa manipulação alimentar pode influenciar diretamente a regulação desses AGE, na formação de eicosanoides, na liberação de citocinas, nas funções de receptores e na composição da membrana celular (ANGULO-GUERRERO E OLIART, 1998; HAGVE *et al.*, 1998; WALLACE *et al.*, 2003). Para isso, são necessários substratos derivados de ácidos graxos essenciais: ácido linolênico (LA), o ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenoico que são utilizados para que ocorra a formação dos mediadores lipídicos (KÖNIG *et al.*, 1996).

O mais relacionado com os processos inflamatórios é o AA que é um ácido graxo poli-insaturado, ancorado nos fosfolipídios de membranas celulares e podem ser liberados através da ativação celular. Diferentes estímulos biológicos, como patógenos ou mediadores solúveis, liberados no processo infeccioso ou por microrganismo, podem

estar envolvidos na ativação do metabolismo de mediadores lipídicos (ROUZER *et al.*, 1982; SUTTORP *et al.*, 1985; FUNK, 2001).

Estes indutores ocasionam o distúrbio da membrana celular e o aumento do cálcio intracelular, resultando na translocação da fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) para a membrana nuclear ocorrendo assim a liberação do AA (LEWIS E AUSTEN, 1984), podendo modificar-se enzimaticamente em compostos biologicamente ativos pela ação das cicloxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs), ou citocromo P450 (CYP 450) (**Figura 6**), (KÖNIG *et al.*, 1997; MESAROS *et al.*, 2009; HAEGGSTRÖM E FUNK, 2011).

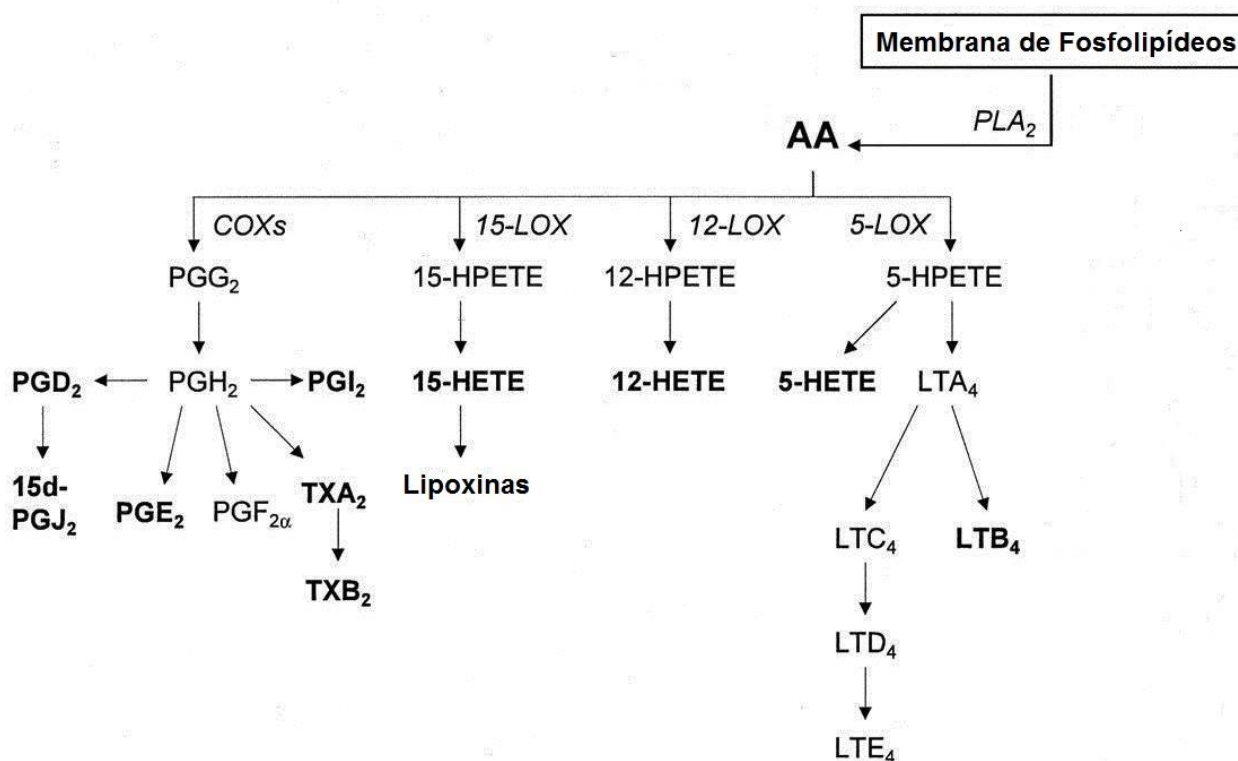


Figura 6: Biossíntese dos eicosanóides

Fonte: Larsson *et al.*, 2013 - Modificado por Filho, PGA

Os eicosanóides produzidos a partir da metabolização do AA incluem as prostaglandinas (PGs) e os leucotrienos (LTs). Estes mediadores lipídicos estão associados, ao processo de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e

recrutamento celular de neutrófilos, colaborando com uma resposta pró-inflamatória, característica dos primeiros estágios da resposta inflamatória aguda. Em estágios tardios, estes mediadores podem ter papel na fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos recrutados para o sítio inflamatório induzindo mudanças na própria produção de classes de mediadores lipídicos, levando a um perfil anti-inflamatório e, consequentemente, uma redução no influxo de células, efeito associado ao processo de resolução da inflamação (LAWRENCE *et al.*, 2002).

Quando a via de metabolização é a COX ocorre à formação de endoperóxidos como os prostanoídes, podendo ser formados através da enzima COX-1, que se apresenta naturalmente nas células e está relacionada com a homeostasia do organismo; ou por meio da COX-2, que tem sua expressão induzida após um estímulo inflamatório, suas funções podem apresentar atividades anti ou pró-inflamatórias. As COXs metabolizam a formação do mediador instável PGH_2 , podendo ser assim, convertida em prostaglandinas (PGD_2 , PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaciclina (PGI_2) e tromboxanos (TXA_2 e TXB_2) pelas respectivas enzimas sintases (KÖNIG *et al.*, 1997; VANE *et al.*, 1998; SMITH *et al.*, 2000).

Três principais tipos de LOX já foram descritas na literatura: 12-LOX e 15-LOX que participam na formação dos hidroxi-eicostetraenóicos (HETEs), e a 5-LOX que é responsável principalmente pela síntese de LTs, que compreendem o LTB_4 , um potente quimioatraente de leucócitos e regulador da ativação, migração e apoptose celular pela ligação aos receptores de BLT_1 e BLT_2 ; e os Cys-LTs (LTC_4 , LTD_4 e LTE_4) (FACCIOLI *et al.*, 1991; FUNK, 2001; PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005), que estão intimamente relacionados com a asma e doenças alérgicas (KANAOKA E BOYCE, 2004), além de ser um forte vasoconstritor atuando em receptores de CysLT_1 e CysLT_2 (DRAZEN *et al.*, 1992), podendo estar relacionado com doenças cardiovasculares (RICCIONI *et al.*, 2010), fibrose (BELLER *et al.*, 2004), câncer (MAGNUSSON *et al.*, 2010) e na resposta imune do hospedeiro frente a vários patógenos (MACHADO *et al.*, 2005; SECATTO *et al.*, 2012).

Ainda pela via das LOXs, ocorre a produção das Lipoxinas (LXA₄ e LXB₄) que são mediadores endógenos anti-inflamatórios, podendo ser produzidos por três vias transcelulares. A primeira é consequência da formação de LTA₄, pela 5-LOX presente em células mielóides, o qual é transformado em LXA₄ pela ação da 12-LOX. A segunda via, abrange a formação pela 15-LOX derivada de monócitos e/ou epitélio, de 15-HETE, o qual é o substrato para 5-LOX de neutrófilos, originando assim a LXA₄ e a LXB₄. E a terceira via, é desencadeada pela aspirina, que inibe irreversivelmente a COX-1 e acetila a COX-2 formando o 15-HETE, transformando em 5-LOX derivada de leucócito, em 15-epi-LXA₄ ou 15-epi-LXB₄ (SERHAN *et al.*, 1984; MITCHELL *et al.*, 2002).

Além destas vias clássicas e melhores estudadas, as CYPs possuem mecanismo bioquímico de converter o AA em ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs), ácidos dihidroxieicosatrienólicos (DHETEs) e ácidos hidroxieicostetraenólicos (HETEs). As formações desses metabólitos podem estar relacionadas a processos fisiológicos, como migração e proliferação de células desencadeando o processo inflamatório (SPECTOR E NORRIS, 2007; PANIGRAHY *et al.*, 2011), ou patológicos, como em doenças renais (MAIER E ROMAN, 2001), hepáticas (SACERDOTI *et al.*, 2003), cardiovasculares (ISSAN *et al.*, 2013) e câncer (PANIGRAHY *et al.*, 2010).

No contexto de infecções por microrganismos, quando ocorre produção de PGE₂, tem sido associado ao aumento da produção de AMP cíclico (cAMP) e supressão da resposta imune do hospedeiro, com a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-2 e IL-1 β . Em contrapartida, a PGE₂ é capaz de induzir a produção de citocinas de perfil Th2, bem como IL-5, IL-4 e imunoglobulinas do tipo IgE e IgG1 (HARRIS *et al.*, 2002).

Quando a via de metabolização está direcionada para produção de LTs, a mesma se correlaciona com eventos de inflamação aguda, com a produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais de oxigênio. Entre os LTs se destacam o LTB₄ (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2005; ROGERIO E ANIBAL, 2012) em doenças infecciosas, e os

chamados cistenil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄), envolvidos na resposta alérgica (PETERS-GOLDEN E HENDERSON, 2007).

Vale ressaltar que todos esses mediadores lipídicos são resultado da oxidação do AA (LTs, PGs, LXs, EETs, HETEs, DHETEs), possuem 20 átomos de carbono e são coletivamente chamados de eicosanoides que se ligam a receptores associados à proteína G (GPCRs) e cooperam nas funções homeostáticas, processo inflamatório e na resposta imune às infecções (FUNK, 2001; MEDEIROS *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005; PERES *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2008; SORGI *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2010; CARLOS *et al.*, 2011; HAEGGSTRÖM E FUNK, 2011; MACHADO *et al.*, 2011; PERES-BUZALAF *et al.*, 2011; SECATTO *et al.*, 2012; TRINDADE *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013).

2.6 Detecção de Eicosanoides

No estudo do metabolismo e produção de mediadores lipídicos, temos o desafio de análises quantitativas e qualitativas do tipo “ômicas”, referente ao estudo da totalidade de um conjunto. O lipidoma tem papel crucial no estudo em larga escala dos lipídeos presentes nas células, nos permitindo analisar as estruturas, funções e interações lipídicas, bem como determinar as mudanças que acontecem durante os processos fisiológicos (BOU KHALIL *et al.*, 2010; SHINDE *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2013).

Várias técnicas analíticas têm sido aplicadas na identificação e quantificação de lipídeos, como por exemplo, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia de fluorescência, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE ou HPLC-UV, do inglês High Performance Liquid Chromatography). No entanto, a mais utilizada e eficiente para identificação e quantificação desta classe de biomoléculas são as técnicas de espectrometria de massas (EM ou MS, do inglês Mass Spectrometry) (MURPHY *et al.*, 2001).

Assim, o lipidoma de eicosanoides é uma importante ferramenta para determinação de todos os possíveis mediadores lipídicos envolvidos na resposta imune à malária.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Caracterizar o perfil de eicosanoides, citocinas e quimiocinas circulantes de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* na cidade de Manaus, Amazonas.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o perfil de eicosanoides (lipidoma) circulantes em pacientes com malária *vivax*, estimulado com Ionóforo de Cálcio A23187 (IC A23187) no dia 0 (D0) e dia 28 (D28);
- Descrever o perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- e IL-17A) e quimiocinas (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10) em sangue periférico de pacientes com malária *vivax* no D0 e D28;
- Relacionar o perfil de eicosanoides encontrados, com as citocinas e quimiocinas produzidas, em pacientes infectados com *Plasmodium vivax* no D0 e D28.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo observacional do tipo longitudinal, com coleta de amostras de pacientes diagnosticados com malária causada pelo *P. vivax* para caracterizar o perfil de eicosanoides e citocinas.

4.2 População de Estudo: Manaus – AM

O Estado do Amazonas é o maior em área territorial do País, com 1.559.161,682 quilômetros quadrados, o equivalente ao território de cinco países, somados: França, Espanha, Suécia e Grécia. Possui um dos mais baixos índices de densidade demográfica do país, com 2,23 habitantes por quilômetro quadrado, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Segundo informações do Censo 2015, o Amazonas é o 14º estado do Brasil e o segundo do Norte em número de habitantes, com um total de 3.938.336, dos quais a maioria reside em área urbana. A capital Manaus (**Figura 7**), um dos 62 municípios do Amazonas, é a cidade mais populosa da Região Norte, com a estimativa de 2.057.711 habitantes. O clima é equatorial úmido, com temperatura média de 26,7°C (Brasil, 2015).

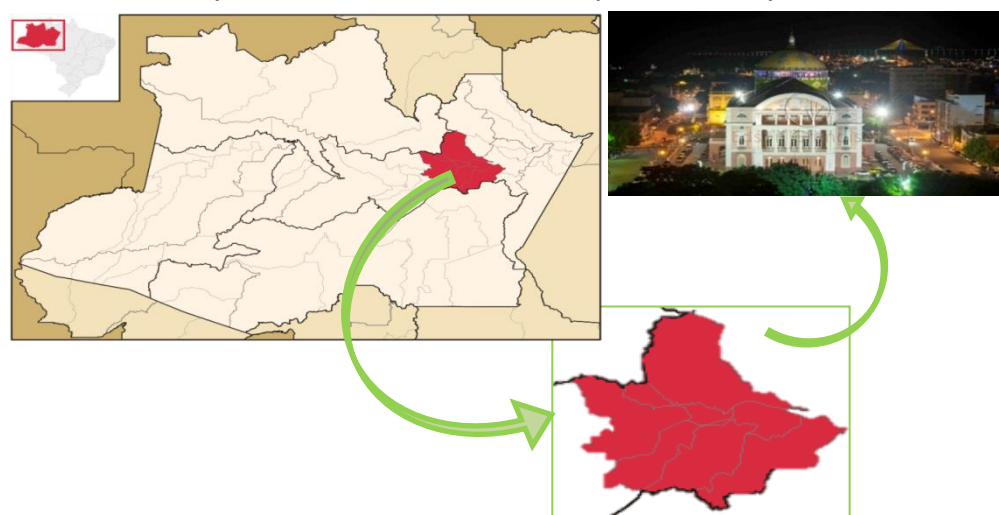


Figura 7: Mapa com a localização da cidade de Manaus-Amazonas-Brasil
Fonte: IBGE, 2015 - Modificado por Filho, PGA

4.3 Amostragem: Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM)

O número (*n*) amostral foi composto por 26 indivíduos. Destes, 14 foram pacientes infectados com *P. vivax* e diagnosticados com Malária por meio da gota espessa no D0, que procuraram atendimento no ambulatório da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Destes, 12 pacientes retornaram para a consulta D2) e foram incluídos no projeto para critério de comparação da resposta imune, entre os dois períodos. Foram enquadrados no grupo controle, 12 candidatos a doação de sangue, atendidos na Fundação Hospitalar de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (HEMOAM), sem reatividade para os testes de triagem sorológica.

4.4 Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão aplicados para os pacientes foram: indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 a 65 anos de idade, com o teste de gota espessa positivo para malária para *P. vivax*. Para os indivíduos controles foram: indivíduos de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 a 65 anos de idade e que não possuíssem nenhuma sorologia positiva para os testes de triagem sorológica (Hepatite C (Anti-HCV, NAT-HCV) Hepatite B (anti-HBc, HBsAg, NAT- HBV), HIV (anti-HIV-I e II, NAT-HIV), HTLV (anti-HTLV-I e II), Doença de Chagas (teste de ELISA) e Sífilis (VDRL).

4.5 Critérios de Exclusão

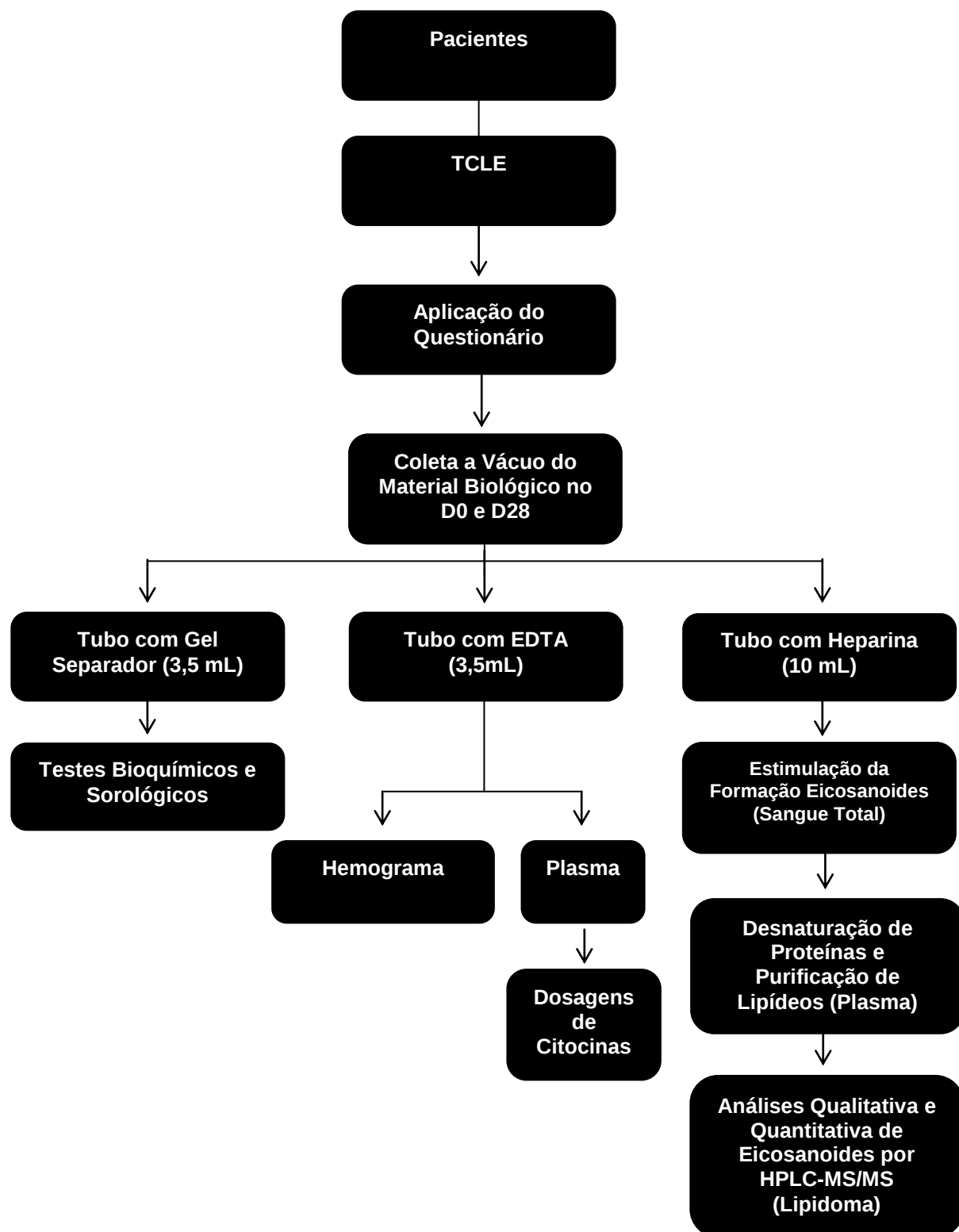
Como critérios de exclusão, tanto para os pacientes quanto para o grupo controle, foram aplicados os seguintes parâmetros: mulheres grávidas, indígenas, pacientes com outras patologias, co-infectados ou em tratamento para malária.

4.6 Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa intitulado “*Caracterização do Perfil de Eicosanoides e Citocinas em Pacientes Infectados com Malária vivax*”, foi aprovado pelos Comitês de

Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP FMT-HVD) CAEE N° 49472515.5.0000.0005 e Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (CEP-FHEMOAM) sob o CAEE N° 49472515.5.3001.0009 (**Apêndice 01**).

4.7 Fluxograma do Projeto



4.8 Coleta de Dados e Material Biológico

A coleta do material biológico e dos dados epidemiológicos foi realizada no período de novembro de 2015 a março de 2016 na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado FMT-HVD (Pacientes) e na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas FHMOAM (Grupo Controle). Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa, assinando posteriormente o *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido* (**Apêndice 02**). Em seguida, foi aplicado o questionário estruturado (**Apêndice 03**), contendo as seguintes informações: número de identificação, data e hora da coleta, nome do candidato, data de nascimento, etnia, peso, sexo, presença de co-morbidades, utilização de medicamentos prévios, consumo de carnes brancas ou vermelhas e que tipo, alimentos ingeridos no dia anterior tipo de óleo que usava para preparar suas refeições, principais sinais e sintomas no momento da coleta, número de episódios de malária, diagnóstico e parasitemia. Todas essas informações adquiridas foram armazenadas por meio do Software Microsoft, Excel® (versão 2010 para Windows), para realização das análises.

Foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue periférico por punção venosa em tubos com sistema a vácuo, contendo EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2 Franklin Lakes, New Jersey, USA*), Heparina de Sódio (*Labor IMPORT® São Paulo, Brasil*) e com Gel separador (*Gel BD SST® II Advance® Franklin Lakes, New Jersey, USA*) para realização do hemograma, testes bioquímicos, sorologias, dosagem de citocinas, purificação de lipídeos e identificação e quantificação de eicosanoides.

4.9 Testes Hematológicos

A avaliação dos índices hematimétricos, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, contagem de hemácias, plaquetas e contagem global e diferencial de leucócitos das amostras foram realizadas com contador hematológico *ADVIA 2120/2120i* (*SIEMENS® Berlin, Germany*) do Laboratório de Análises Clínicas da Fundação HEMOAM.

4.10 Dosagem de Citocinas Plasmáticas por Citometria de Fluxo, usando kit CBA (*Cytometric Bead Array*)

A dosagem de citocinas das amostras de plasma dos pacientes com malária *vivax* e do grupo controle foram realizadas pela técnica de Citometria de Fluxo, usando o kit CBA (*Cytometric Bead Array*) *BD™ Human TH1/TH2/TH17 Cytokine* (Cat. N° 560484, Lot 5030932.), Kit *BD™ Human Chemokine* (Cat. N° 552990, Lot. 5069733) da marca *BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*, seguindo as orientações descritas pelo fabricante. As citocinas dosadas foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL17-A, IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10.

O Kit *BD™ CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo *FACSCanto II* (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia.

O software *FCAP-Array™ (v3.0.1)* foi utilizado para calcular as concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina.

4.11 Testes Bioquímicos- Lipidograma, Dosagens Hepáticas e Renais

Para avaliação das frações de glicose, lipídeos totais colesterol total, HDL, LDL, VLDL, Triglicerídeos, fosfatase alcalina, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), bilirrubina total, direta, indireta, ácido úrico,

creatina e ureia as amostras de sangue total foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Hospitalar de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (HEMOAM), tendo suas dosagens realizadas através de método automatizado utilizando o aparelho *ARCHITECT® i2000 SR* (ABBOTT® Chicago, Illinois, USA).

4.12 Identificação e Quantificação de Eicosanoides

Para a identificação e quantificação desses mediadores lipídicos foi utilizada a técnica de lipidoma, seguindo quatro passos descritos por Galvão *et al.*, (2016).

4.12.1 Estimulação da formação de Eicosanoides a Partir do Sangue Total Periférico

A estimulação do sangue periférico para produção de eicosanoides foi feita através da estimulação *in vitro* do sangue total (1 mL) dos pacientes com malária *vivax* e do grupo controle com o seguinte estímulo: IC A23187 (20 µM) *SIGMA-ALDRICH Life Science* (Lot. 025M4021V). Foi utilizado como controle negativo o Dimetilsulfóxido (DMSO) *SIGMA-ALDRICH Life Science* (Lot. RNBB5428). As amostras ficaram por 20 minutos, em banho-maria a 37°C sob agitação. Após este período, a reação foi bloqueada em banho de gelo, e o sangue total estimulado foi centrifugado a 400 x g, por 20 minutos a 4° C. O plasma obtido (aproximadamente 300 µL) foi posteriormente armazenado em freezer -80°C, sendo esta etapa realizada no laboratório multidisciplinar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM).

4.12.2 Desnaturação de proteínas e Purificação de Lipídeos de Amostras de Plasma Humano

Inicialmente, as proteínas do plasma foram desnaturadas, empregando cinco volumes de uma mistura de metanol/acetonitrila 1:1 (v/v) (gelado). Após agitação em tubo e precipitação das proteínas, o plasma foi centrifugado a 400 x g, por 20 minutos a

4° C contendo 200 ng de 12-epi-LTB₄-d₄ como padrão interno (PI). Após a centrifugação, o precipitado foi descartado e 1,2 mL de sobrenadante foi obtido e em seguida foi adicionado 14 mL água (Ultra-pura) para proporção final de 15% (v/v) entre fase orgânica e fase aquosa. A purificação, dos eicosanoides, foi realizada no sobrenadante do plasma desproteínizado, empregando extração em fase sólida (do inglês *solidphaseextraction*, SPE) usando um Waters® *Extraction Manifold* e cartuchos Sep-Pak C18, 500mg sorbent, 2,8 mL, HyperSep™ (ThermoScientific, USA). Resumidamente, as amostras foram transferidas para cartuchos pré-ativados com 2 mL de metanol e 2 mL de solução água/ácido acético a 0,1 % (v/v). Após a eluição das amostras de plasma, foi adicionado 2mL de água/ácido acético a 0,1 % (v/v) ao cartucho para eluir compostos polares hidrofílicos, e por fim os eicosanoides aderidos na sílica de C18, foram eluídos com 2 mL de solução metanol/ácido acético a 0,1% (v/v). O solvente foi removido sob pressão reduzida em *speedvac*, e no extrato obtido adicionava-se 100 µL de metanol, sendo esta etapa realizada no laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), coordenado pela Profa Dra Lúcia Helena Faccioli.

4.12.3 Análises Qualitativa e Quantitativa de Eicosanoides por HPLC-MS/MS (Lipidoma).

Após a etapa de desnaturação de proteínas e purificação de lipídeos realizou-se as análises de HPLC-MS/MS empregando um sistema Acquity™ UPLC (Waters®) composto por uma bomba quaternária e injetor automático acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização ESI equipado com Z-spray ortogonal (Waters®).

Foram preparadas soluções-estoque da mistura de eicosanoides a 1,2 µg/mL em metanol, bem como de PI na mesma concentração, que foram armazenadas a -80 °C. A partir da solução-estoque foram preparadas as soluções de trabalho, através de diluição seriada, pela fortificação de 300 µL de plasma branco com 18,75 µL de solução

padrão da mistura de eicosanoides na correspondente concentração e pela adição de 8,4 µL da solução de PI a 1,2 µg/mL.

Para a aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software Masslynx 4.1 (Micromass, Manchester, UK). As análises cromatográficas foram realizadas em coluna C18 Ascentis EXPRESS (100 mm x 4,6 mm, 2,7 µm) empregando uma vazão de 0,6 mL/min a 25 °C. A eluição foi feita empregando um sistema de gradiente binário constituído por água:acetonitrila:ácido acético (69,98:30:0,02,v/v/v) (Fase A) e acetonitrila:isopropanol (70:30, v/v) (Fase B) com 0% de B de 0 a 2 minutos, aumentando para 15% de B aos 2 minutos, 20% de B aos 5 minutos, 35% de B aos 8 minutos, 40% de B aos 11 minutos, 100% de B aos 15 minutos permanecendo nesta proporção até 19 minutos. Deste tempo até 30 minutos, a gradiente retornou à proporção inicial para condicionamento da coluna, conforme representado na **Tabela 1**. A fonte de ionização operou em modo negativo e por MRM.

Tabela 1: Gradiente de eluição dos mediadores lipídicos

Tempo (min)	Fase móvel (%)	
	A	B
0 - 2	100	0
2 - 5	85	15
5 - 8	80	20
8 - 11	65	35
11 - 15	60	40
15 - 19	0	100
19 - 30	100	0

Para otimização das condições de MRM, uma solução padrão de cada eicosanoide a 100 ng/mL diluído em metanol:água:acetato de amônio (71:30:0.1, v/v/v) foram

infundidos no MS a 10 µL/min e fragmentados via CID com argônio, a fim de obter o espectro do íon produto de cada analito. Após a seleção das transições de MRM, as energias do cone e de colisão foram padronizadas através da infusão direta dos padrões para obtenção de uma sensibilidade adequada. A linearidade foi avaliada através de uma curva de calibração, em triplicata, das amostras de plasma enriquecidas com soluções-padrão de LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTD₄, 11-trans-LTD₄, LTE₄, PGD₂, PGE₂, 20-OH-PGE₂, 15-keto-PGE₂, 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂, PGJ₂, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 20-HETE, (±)11,12-DHET, (±)14,15-DHET, 5-Oxo-ETE, 11,12-EET, 5(S),6(R)-DiHETE, LXA₄ e TXB₂ (**Figura 8**), *Cayman Chemical* e extraídas pelo método descrito no item , de modo a obter concentrações finais de 5,0; 7,5; 15,0; 30,0; 50,0 e 75,0 ng/mL. Para o LTB₄, 5-HETE, 12-HETE e TXB₂ *Cayman Chemical* também foi construída uma curva de linearidade contemplando as seguintes concentrações: 75,0; 150,0; 300,0; 450,0; 800,0 e 1000,0 ng/mL.

O gráfico de calibração foi construído plotando-se no eixo das abscissas os valores de concentração plasmática de cada eicosanoide e no eixo das ordenadas a razão entre a área dos picos obtidos para cada mediador e a área do PI. A análise dos dados foi feita através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, em que a relação área/concentração é expressa pela equação da reta ($y = ax + b$), sendo a o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta. Também foi calculado, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação (r), parâmetro este que estima a linearidade da curva de calibração.

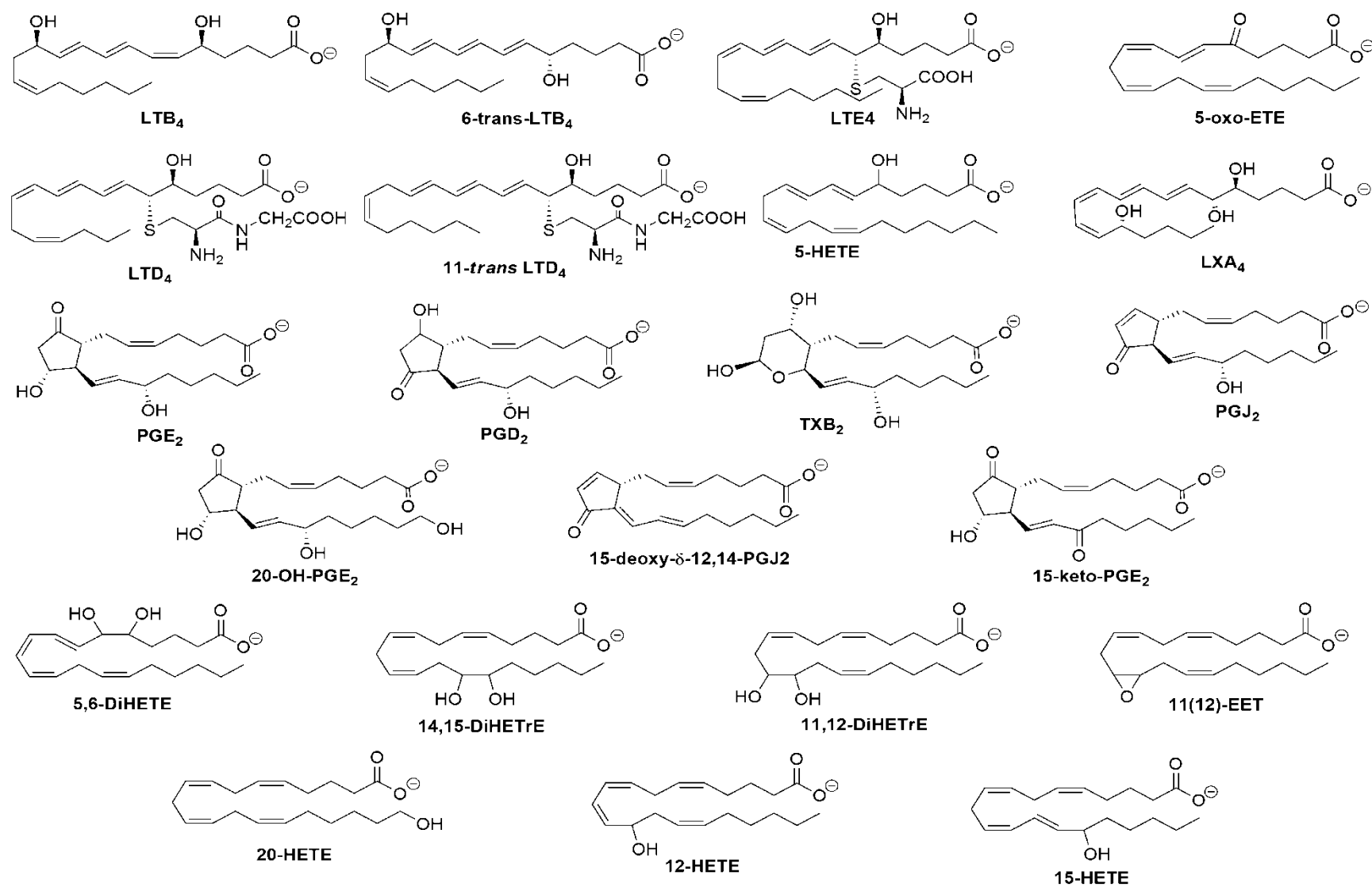


Figura 7: Estrutura química dos eicosanoides analisados neste trabalho (As estruturas foram desenhadas no programa chemdraw).

4.13 Análises Estatísticas Convencionais

Os dados clínicos-epidemiológicos, laboratoriais, as concentrações de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos foram tabulados e armazenados por meio do Software Microsoft, Excel® (versão 2010 para Windows). As análises descritivas foram apresentadas em tabelas e gráficos de distribuição de frequências, elaboradas no software *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA), levando em consideração que os dados possuem uma distribuição não paramétrica. As análises comparativas entre os grupos foram realizadas com os testes de Mann-Whitney (Controle versus Paciente D0) e pareado de Wilcoxon (paciente D0 versus paciente D28), sendo estipulado como valores significativos o $p < 0,05$.

4.14 Análises Estatísticas não Convencionais

Foi realizada a mediana global de todos os grupos estudados, para montar as curvas de assinatura e gráficos em forma de radar indicando a porcentagem de altos e baixos produtores. Além disso, foi realizada análise de Networks (redes) e demonstração das interações complexas entre as citocinas, quimiocina e mediadores lipídicos utilizando o software *Cytoscape 3.0.4* (Cytoscape Consortium San Diego, CA, USA) conforme utilizados nos trabalhos publicados por Guimarães da Costa *et al.*, (2014) e de Souza-Cruz *et al.*, (2016)

Resultados

5 RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 14 pacientes infectados com *P. vivax* que relataram terem se automedicado com substâncias não-esteroidais ao diagnóstico (D0). Contudo, após 28 dias (D28) a partir do início do tratamento, foram coletadas amostras de 12 pacientes que retornaram ao ambulatório de malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). Além disso, foram coletadas amostras de 12 candidatos a doação de sangue oriundos da Fundação Hospitalar de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (HEMOAM), enquadrados no grupo controle.

5.1 Dados Demográficos e Características Clínico-Epidemiológicas

Na **Tabela 2**, estão descritos os dados demográficos e as características clínico-epidemiológicas dos pacientes e dos indivíduos enquadrados no grupo controle. As informações foram adquiridas através de questionário estruturado e dos resultados dos exames parasitológicos, testes hematológicos e bioquímicos.

A faixa etária no grupo de pacientes foi maior que no grupo controle. Em relação ao gênero, constatamos um maior número de indivíduos do sexo masculino tanto no grupo de pacientes com malária (57%) quanto no controle (58%). Quanto a parasitemia, foram observados pacientes com carga parasitaria de + (28,5%) e ++ (71,5%), além de apresentarem sintomatologia clássica da doença. Cefaleia (92,8%) foi o sintoma mais relatado, seguido de vômitos (57,1%), mialgia (50%), febre (35,7%), náuseas (28,5%) e calafrio (28,5%). Sintomas como artralgia (14,2%), dor abdominal (14,2%), parestesia (7,1%) e tontura (7,1%), também foram mencionados.

Tabela 2: Dados demográficos e características clínico-epidemiológicas dos pacientes com malária-vivax e grupo controle.

Características		Controles (n=12)	Pacientes D0 (n=14)
Demográficas e Epidemiológicas			
Masculino/Feminino		7/5	8/6
Idade (média±DP)		34.17±9.675 (18-51)	40.07±15.58 (19-60)
Parasitológicos (Parasitas/ mm³)			
Parasitemia	301-500 (+)	-	4 (28.5%)
	501-10.000 (++)	-	10 (71.5%)
Parâmetros Clínicos			
Cefaleia, n (%)		-	13(92.8%)
Febre, n (%)		-	6(35.7%)
Artralgia, n (%)		-	2(14.2%)
Mialgia, n (%)		-	7(50%)
Vômito, n (%)		-	8(57.1%)
Náuseas, n (%)		-	4(28.5%)
Calafrio, n (%)		-	4(28.5%)
Dor Abdominal, n (%)		-	2(14.2%)
Parestesia, n (%)		-	1(7.1%)
Tontura, n (%)		-	1(7.1%)

Em relação às características hematológicas, podemos observar uma diminuição significativa no hematócrito, leucócitos totais, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas quando comparamos o grupo de pacientes no D0 aos controles. No entanto, observamos um aumento significativo nos leucócitos totais, eosinófilos, basófilos, linfócitos e plaquetas no D0 quando comparado ao D28. Ao analisarmos as dosagens bioquímicas observamos uma diminuição significativa no colesterol total, HDL e LDL um aumento significativo de bilirrubinas totais, direta e indireta quando comparamos os pacientes D0 com o grupo controle. Ao compararmos o paciente D0 com o D28 percebemos um aumento significativo no colesterol total e HDL e uma diminuição significativa na glicose, bilirrubinas totais, direta e indireta conforme descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Dados Laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) dos pacientes com malária no D0, D28 e grupo controle.

Características Hematológicas Bioquímicas (Média±DP)	Controles (n=12)	Paciente D 0 (n=14)	Paciente D 28 (n=12)	p value
Hemácias mm ³	4.828±0.3752	4.351±0.7558	4.492±0.4937	0.0849; 0.4648
Hemoglobina g/dl	14.31±1.413	12.85±2.140	13.35±1.333	0.0576; 0.4258
Hematócrito %	42.10±3.383	37.28±6.034	39.39±4.330	0.0220 a x b*; 0.2754
VCM fl	87.32±5.226	86.03±4.154	87.79±4.706	0.7381; 0.2783
HCM pg	29.68±2.748	29.61±1.306	29.77±1.393	0.8774; 0.4065
CHCM g/dl	33.98±1.464	34.45±0.8645	33.93±1.094	0.2466; 0.2408
RDW %	13.32±0.4821	14.23±2.041	14.46±1.118	0.1781; 0.9054
Leucócitos Totais mm ³	7069±1679	5239±1451	6508±1674	0.0117 a x b*; 0.0144 b x c#
Neutrófilos mm ³	3936±1212	3428±1314	3325±1667	0.3159; 0.5771
Eosinófilos mm ³	301.5±177.4	124.4±97.46	286.8±154.2	0.0013 a x b*; 0.0186 b x c#
Basófilos mm ³	30.75±18.77	10.64±28.04	45.36±43.87	0.0019 a x b*; 0.0010 b x c#
Linfócitos mm ³	2348±697.9	1337±927.4	2207±679.2	0.0031 a x b*; 0.0010 b x c*
Monócitos mm ³	453.6±103.5	320.8±141.4	323.2±87.04	0.0168 a x b*; 0.7646
Plaquetas mm ³	266800±62610	140600±8290 0	263800±8483 0	0.0006 a x b*; 0.0010 b x c#
VPM fl	7.775±0.8292	7.743±1.199	7.273±1.015	0.7184; 1.0000
Lipídios Totais mg/dl	651.7±115.4	561.8±67.18	574.2±65.01	0.0506; 0.9658
Triglicerídeos mg/dl	184.6±108.0	171.2±68.27	132.3±52.44	0.9350; 0.1139
Colesterol Total mg/dl	175.8±36.29	119.6±26.55	168.9±32.07	0.0013 a x b*; 0.0039 b x c#
HDL mg/dl	47.25±8.013	21.08±13.45	46.64±12.23	0.0002 a x b*; 0.0020 b x c#
LDL mg/dl	96.75±24.14	64.38±21.65	95.91±30.56	0.0016 a x b*; 0.0142 b x c#
VLDL mg/dl	39.08±19.46	34.15±13.57	26.36±10.54	0.6634; 0.1258
Glicose mg/dl	116.9±29.46	138.7±67.17	111.2±38.68	0.2268; 0.0029 b x c#
Ácido Úrico mg/dl	4.517±1.399	4.278±1.192	4.600±1.303	0.8308; 0.1250
Creatinina mg/dl	0.9133±0.1295	0.9308±0.152 8	0.8191±0.211 2	0.7491; 0.1641
Ureia mg/dl	29.45±5.855	29.41±9.485	24.28±6.608	0.8571; 0.0273
Fosfatase Alcalina U/l	82.99±14.53	99.32±38.01	83.92±28.28	0.2468; 0.0662
TGO U/l	36.83±9.427	45.00±62.29	24.55±5.749	0.1897; 0.0910

TGP U/l		35.07±21.73	41.89±56.15	23.35±7.379	0.6070; 0.3319
Bilirrubina mg/dl	Total	0.4117±0.3372	1.876±1.298	0.6191±0.475 7	0.0002 a x b*; 0.0078 b x c#
	Direta	0.1400±0.08852	0.5682±0.196 9	0.2400±0.159 0	0.0001 a x b*; 0.0156 b x c#
	Indireta	0.2717±0.2500	1.308±1.216	0.3791±0.321 2	0.0004 a x b*; 0.0078 b x c#

a x b= comparação do grupo de pacientes D0 com o grupo controle; b x c= comparação do grupo de pacientes D0 com pacientes D28 ;*teste não paramétrico de *Mann Whitney* # teste pareado não paramétrico de *Wilcoxon*.

5.2 O papel dos Mediadores Lipídicos (Eicosanoides) nos Pacientes com Malária-vivax

Para descrevermos o papel dos mediadores lipídicos na infecção por *Plasmodium vivax*, foram selecionados 22 eicosanoides envolvidos em processos inflamatórios (LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTE₄, 5-Oxo-ETE, LTD₄, 11-trans LTD₄, 5-HETE, LXA₄, PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGJ₂, 20-OH-PGE₂, 15-deoxy-δ-12,14-PGJ₂, 15-keto-PGE₂, 5,6-DiHETE, 14,15-DiHETrE, 11,12-DiHETrE, 11(12)-EET, 20-HETE, 12-HETE e 15-HETE). Após o estímulo das amostras com IC A23187, identificou-se a presença, com concentrações detectáveis, dos eicosanoides LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTE₄, PGE₂, 15-keto-PGE₂, TXB₂, 5-Oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE e 15-HETE. As concentrações séricas dos eicosanoides estão descritas em ng/mL e foram utilizadas nas análises entre os grupos estudados.

5.2.1 Perfil de Leucotrienos

Ao compararmos o grupo de pacientes no D0 com o grupo controle, observamos uma diminuição estatisticamente significativa das concentrações de LTB₄ (p<0,0001) e 6-trans-LTB₄ (p=0,0009), não havendo concentração detectável para LTE₄. No entanto, notamos um aumento significativo de LTB₄ (p=0,0015) e 6-trans-LTB₄ (p=0,0020) quando comparamos os pacientes no D28 com D0 **Figura 09**.

5.2.2 Perfil de Prostaglandinas e Tromboxanos

A PGE₂ não apresentou valores detectáveis no grupo de pacientes com malária, somente no grupo controle, porém para 15-keto-PGE₂ ocorreu o contrário. No entanto,

quando observamos o TXB_2 notamos uma diminuição significativa na sua concentração quando comparamos o grupo de pacientes D0 com o controle ($p=0,0138$) e um discreto aumento, apesar de não significativo ($p=0,1514$), quando comparamos o grupo de pacientes D28 com o D0, como demonstrado na **Figura 10**.

5.2.3 Perfil de HETES

Ao analisarmos as concentrações dos eicosanoides 5-HETE, 5-Oxo-ETE, 12-HETE e 15-HETE, observamos diminuição significativa no grupo de pacientes no D0 quando comparados ao grupo controle ($p<0,0001$, $p=0,0001$, $p=0,0005$ e $p<0,0001$). Ao compararmos os pacientes no D0 com o D28, nota-se que as concentrações de 5-Oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE apresentavam-se elevadas no D28 ($p=0,0025$, $p=0,0025$ e $p=0,0024$), com exceção do 15-HETE ($p=0,7127$). Os dados descritos acima estão demonstrados na **Figura 11**.

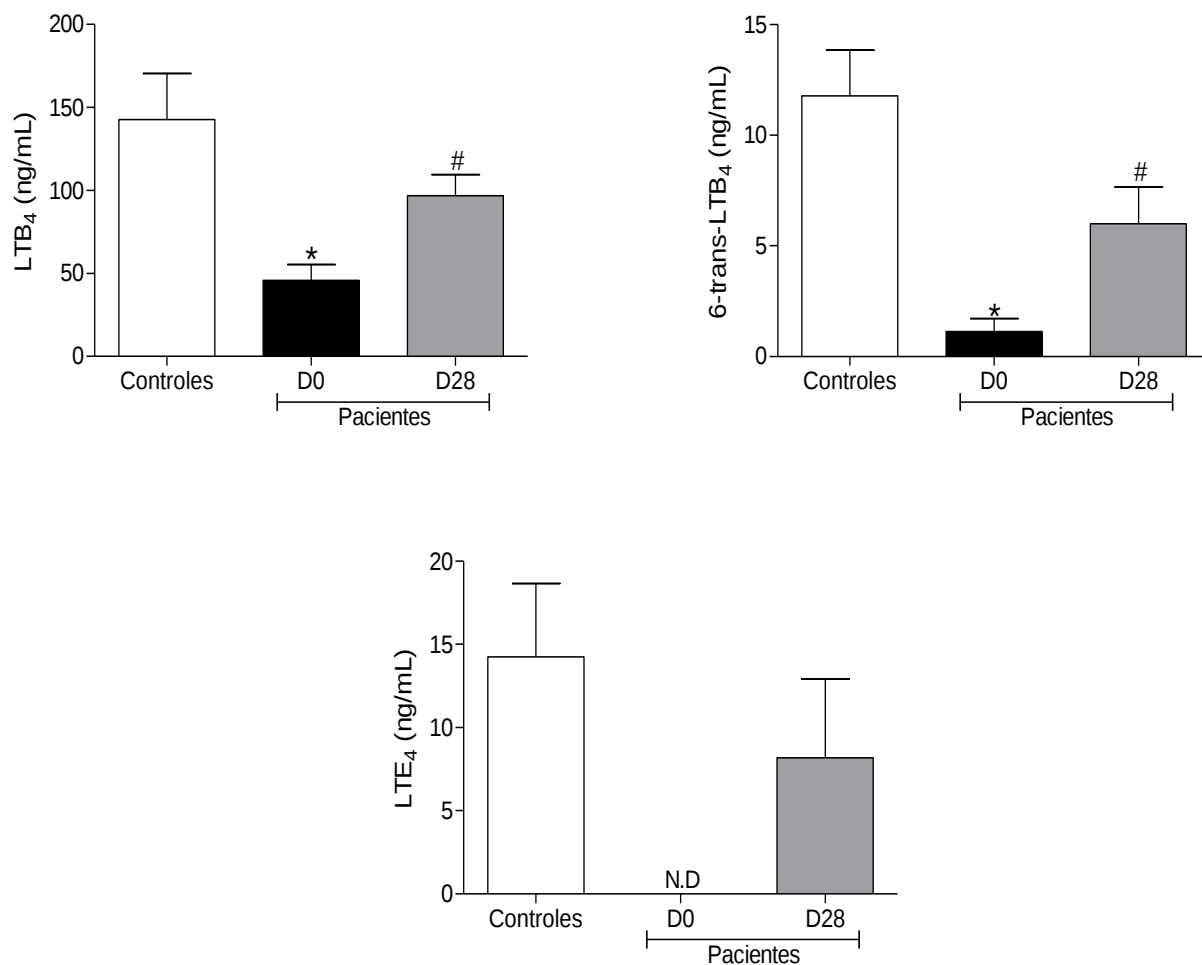


Figura 8: Concentrações séricas de LTB₄, 6-trans-LTB₄ e LTE₄ em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o *Plasmodium vivax* após a estimulação *in-vitro*.

Concentração dos eicosanoides LTB₄, 6-trans-LTB₄ e LTE₄ em pacientes com malária (Pacientes D0=■), pacientes que estão na fase de convalescença da doença (Pacientes D28=■) e Indivíduos não-infectados (Controles=□). O volume de 1mL de sangue periférico foi estimulado com Ionóforo de Cálcio A23187 e os eicosanoides foram quantificados por HPLC-MS/MS após extração por SPE, os resultados foram expressos como valores médios ± desvio padrão de eicosanoides (ng/mL). “*” indica o grupo de pacientes do Dia 0 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste T não paramétrico de *Mann Whitney*, “#” indica o grupo de pacientes do dia 28 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo de pacientes do dia 0 obtido através do teste T pareado não paramétrico de *Wilcoxon* e o “N.D” indica a não detecção de determinado eicosanoide nos grupos estudados.

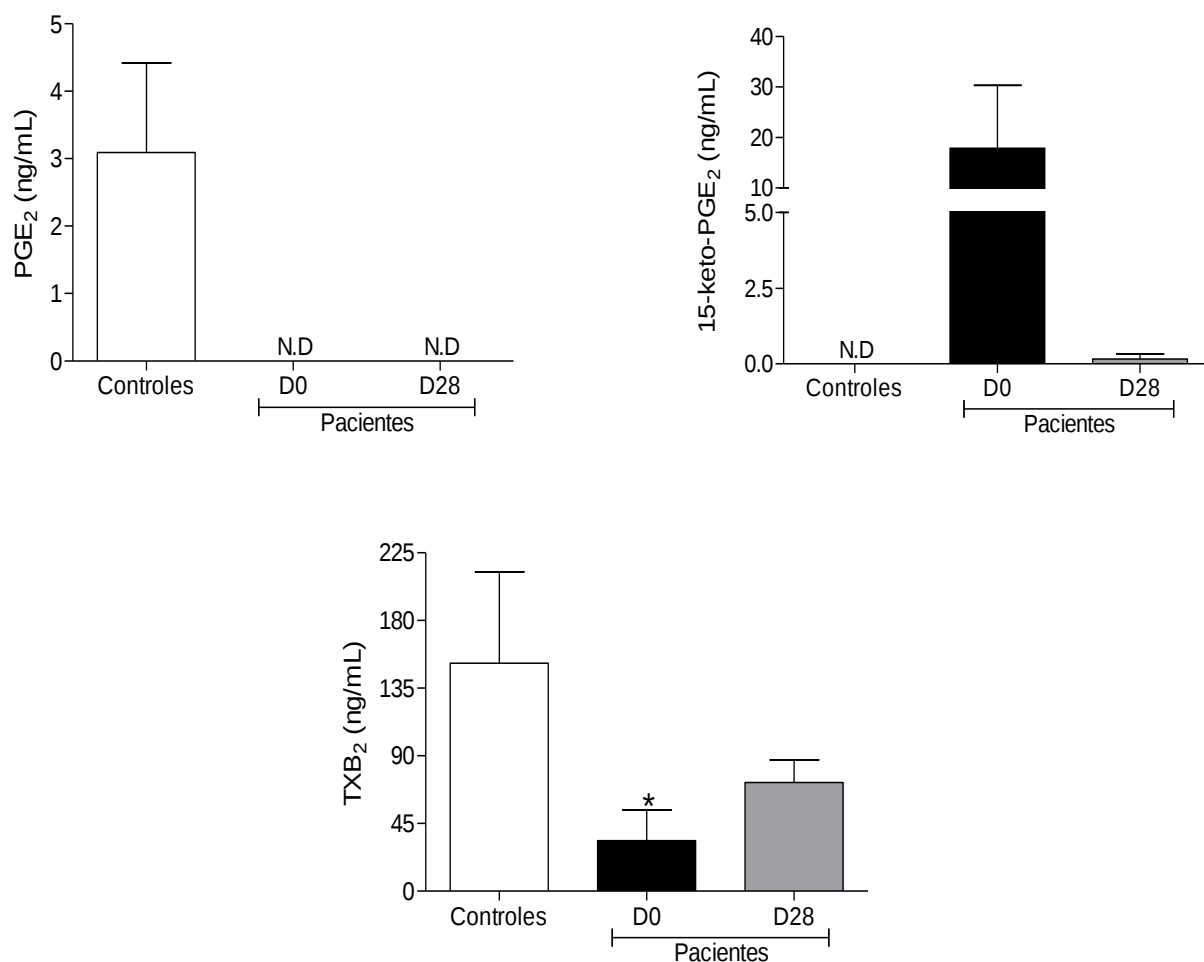


Figura 9: Concentrações séricas de PGE₂, 15-keto-PGE₂ e TXB₂, em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com *o Plasmodium vivax* após a estimulação *in-vitro*.

Concentração dos eicosanoides PGE₂, 15-keto-PGE₂ e TXB₂ em pacientes com malária (Pacientes D0=■), pacientes que estão na fase de convalescença da doença (Pacientes D28=■) e Indivíduos não-infectados (Controles=□). O volume de 1 mL de sangue periférico foi estimulado com Ionóforo de Cálcio A23187 e os eicosanoides foram quantificados por HPLC-MS/MS após extração por SPE, os resultados foram expressos como valores médios ± desvio padrão de eicosanoides (ng/mL). “*” indica o grupo de pacientes do Dia 0 que apresentaram valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste T não paramétrico de *Mann Whitney*, “#” indica o grupo de pacientes do dia 28 que apresentaram valores significativamente diferentes (p<0,05) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo de pacientes do dia 0 obtido através do teste T pareado não paramétrico de *Wilcoxon* e o “N.D” indica a não detecção de determinado eicosanoide nos grupos estudados.

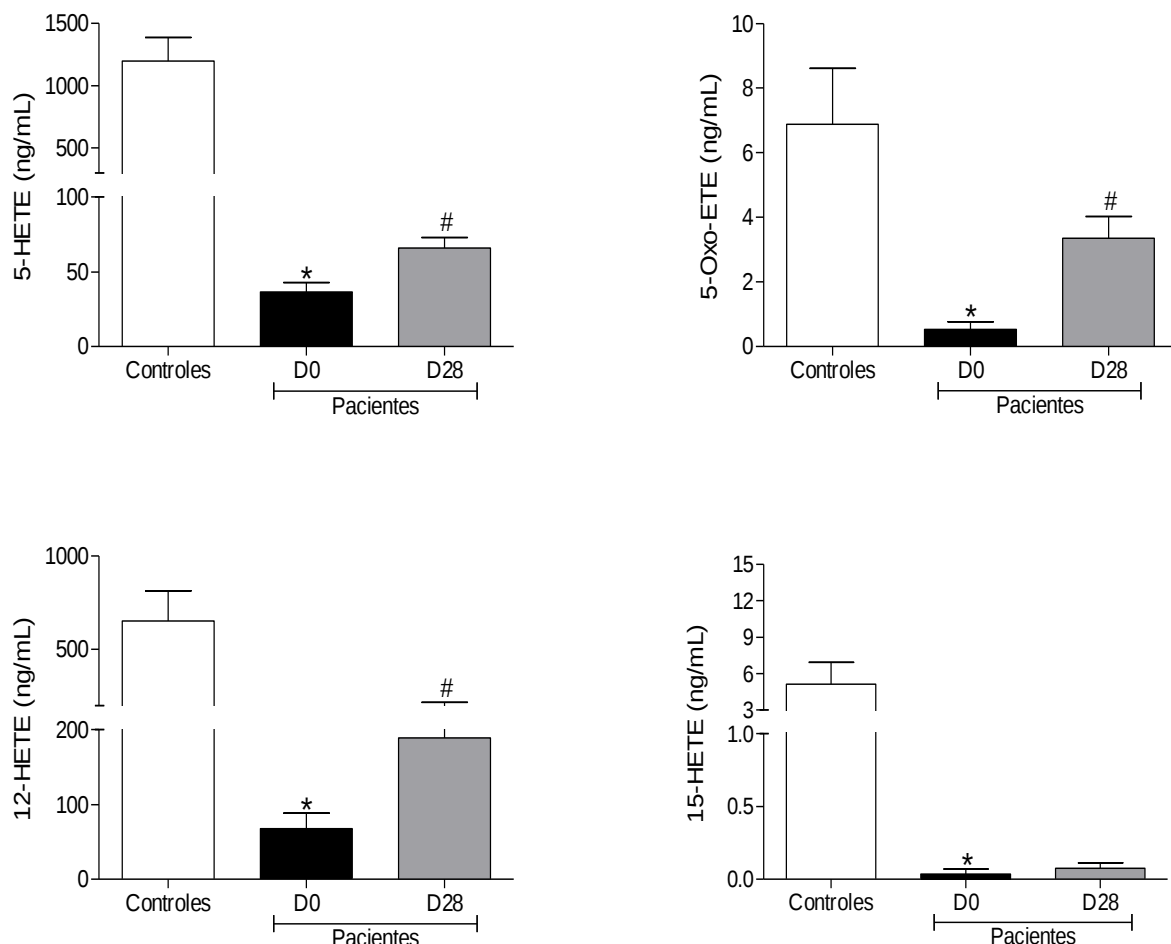


Figura 10: Concentrações séricas de 5-HETE, 5-Oxo-ETE, 12-HETE e 15HETE em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com *o Plasmodium vivax* após a estimulação *in-vitro*.

Concentração dos eicosanoides 5-HETE, 5-Oxo-ETE, 12-HETE e 15HETE em pacientes com malária (Pacientes D0= ■), pacientes que estão na fase de convalescença da doença da doença (Pacientes D28= ■) e Indivíduos não-infectados (Controles= □). O volume de 1 mL de sangue periférico foi estimulado com Ionóforo de Cálcio A23187 e os eicosanoides foram quantificados por HPLC-MS/MS após extração por SPE, os resultados foram expressos como valores médios $\pm$ desvio padrão de eicosanoides (ng/mL). “*” indica o grupo de pacientes do Dia 0 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste T não paramétrico de *Mann Whitney*, “#” indica o grupo de pacientes do dia 28 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo de pacientes do dia 0 obtido através do teste T pareado não paramétrico de *Wilcoxon* e o “N.D” indica a não detecção de determinado eicosanoide nos grupos estudados.

5.3 CONCENTRAÇÕES DAS CITOCINAS SÉRICAS NOS PACIENTES COM MALÁRIA

O perfil de citocinas e quimiocinas dos pacientes com malária, infectados com *P. vivax*, foi traçado com a análise das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10. As concentrações séricas das citocinas estão descritas em pg/mL e foram utilizadas nas análises estatísticas.

5.3.1 Citocinas do Perfil Th1, Th2 e Th17

A **Figura 12** mostra as concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4 e TNF- α entre o grupo controle e de pacientes com malária no D0 e D28, no entanto não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p=1,000$, $p=0,977$ e $p=0,2500$).

As citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-17A apresentaram aumento significativo em suas respectivas concentrações, quando comparamos os pacientes no D0 com o grupo controle ($p<0,0001$, $p<0,0001$, $p=0,0069$ e $p=0,0324$). Ao compararmos o grupo de pacientes no D0 com o D28, observamos uma diminuição significativa nas concentrações dessas mesmas citocinas, exceto para a IL-17A ($p=0,0005$, $p=0,0005$, $p=0,0233$ e $p=0,0664$), (**Figura12**).

5.3.2 Perfil de Quimiocinas

As quimiocinas IL-8, MIG, MCP-1 e IP-10 mostraram aumento significativo no grupo de pacientes no D0 quando comparados com o controle ($p=0,0001$, $p<0,0001$, $p=0,0051$ e $p<0,0001$). No entanto RANTES mostrou diminuição significativa ($p<0,0002$). Ao compararmos os resultados dos pacientes no D0 com o D28, as quimiocinas IL-8, MIG, MCP-1 e IP-10 apresentaram-se diminuídas ($p=0,0098$, $p=0,0010$, $p=0,0049$ e $p=0,0010$) enquanto RANTES mostrou-se aumentada ($p=0,0095$) como demonstrada na **Figura 13**.

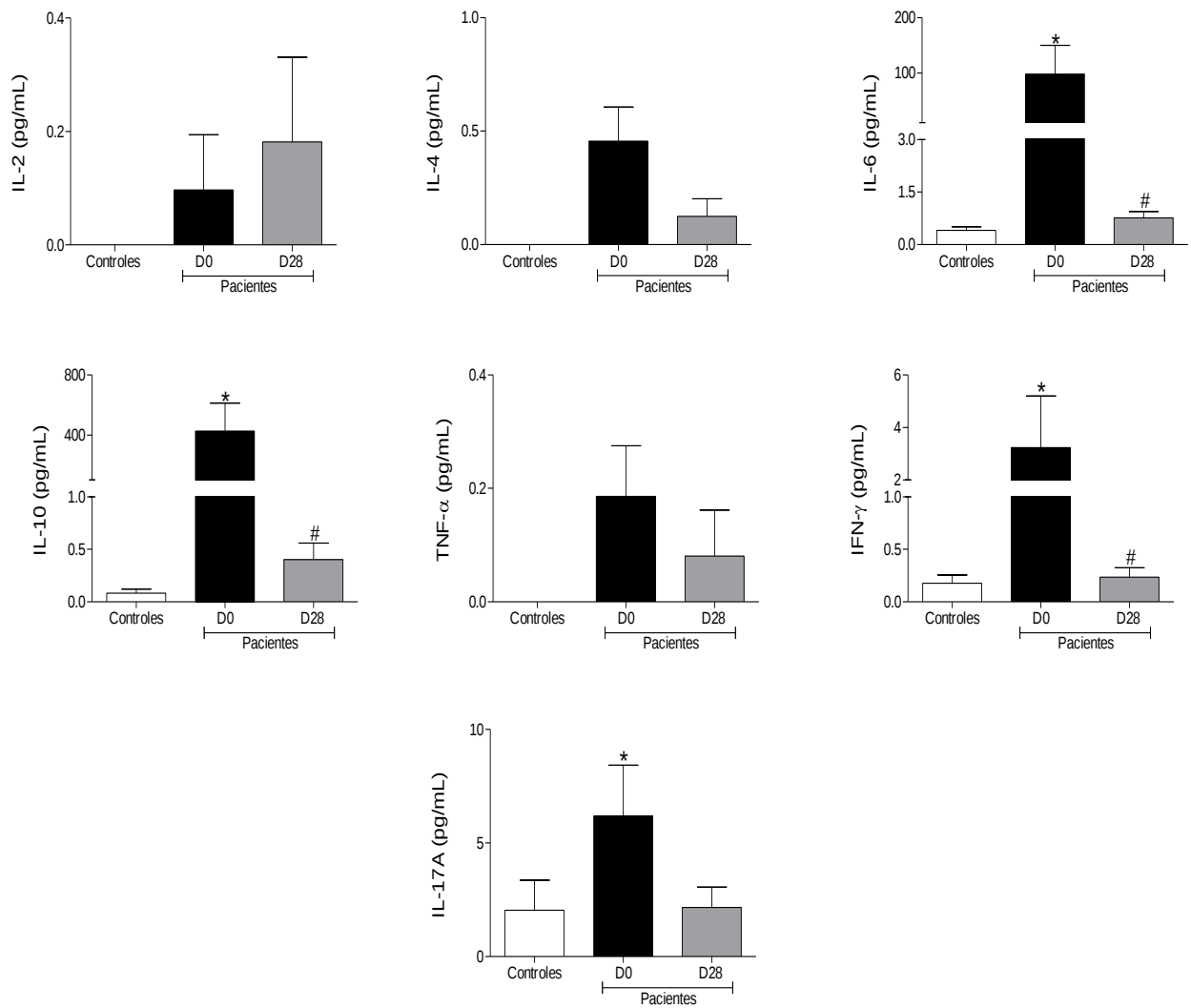


Figura 11: Concentrações séricas de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com *o Plasmodium vivax*.

Concentrações séricas de citocinas em pacientes com malária (Pacientes D0= ■), pacientes que estão na fase de convalescença da doença (Pacientes D28= ■) e Indivíduos não-infectados (Controles =□). O teste Cytometric beads array (CBA) foi utilizado para quantificar as concentrações de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN-γ e IL-17A, os resultados foram expressos como valores médios ± desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL). “*” indica o grupo de pacientes do Dia 0 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste T não paramétrico de *Mann Whitney* e o “#” indica o grupo de pacientes do dia 28 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo de pacientes do dia 0 obtido através do teste T pareado não paramétrico de *Wilcoxon*.

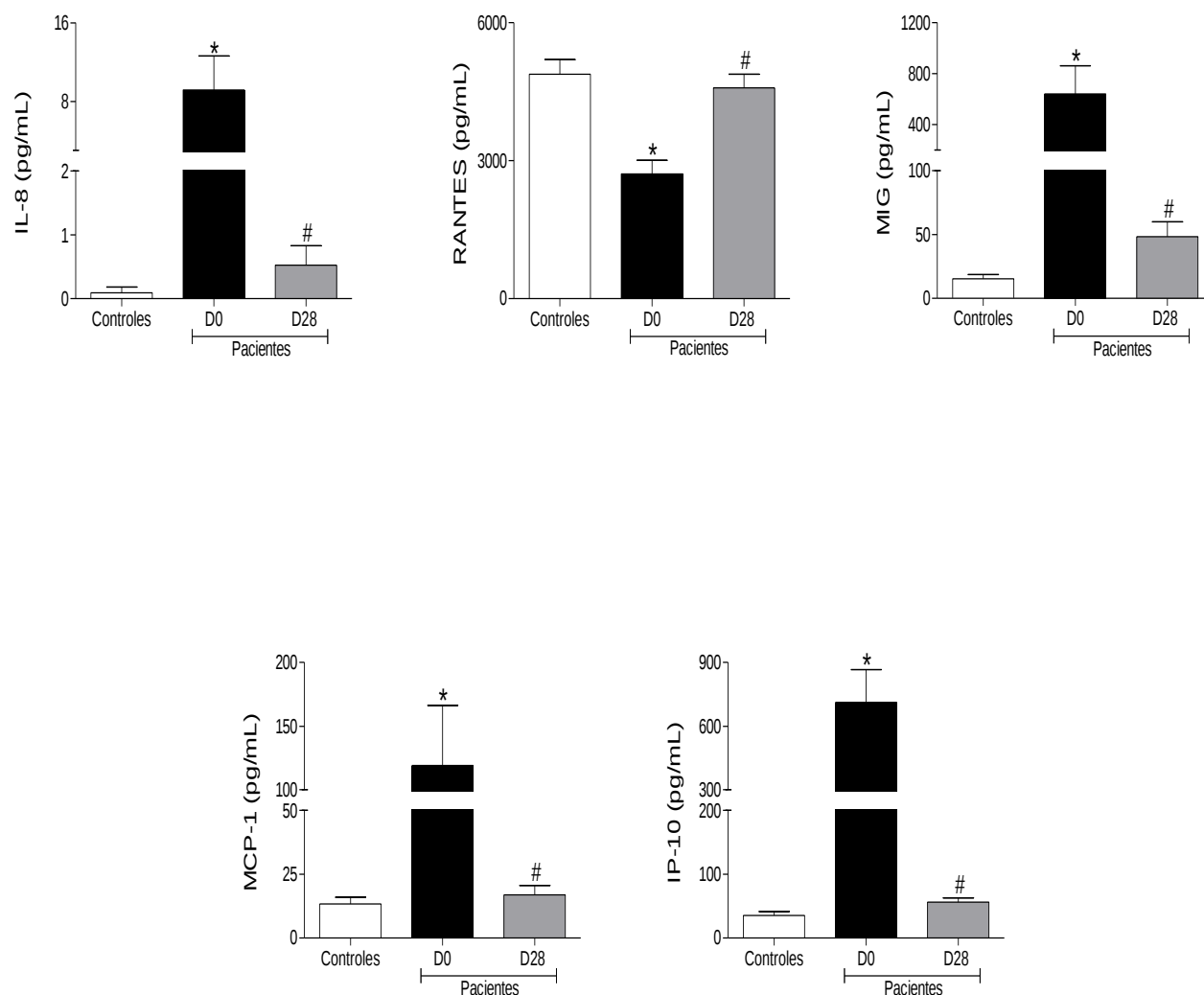


Figura 12: Concentrações séricas de quimiocinas em plasmas de indivíduos saudáveis e infectados com o *Plasmodium vivax*.

Concentrações séricas de Quimiocinas em pacientes com malária (Pacientes D0= ■), pacientes que estão na fase de convalescença da doença (Pacientes D28= ▒) e Indivíduos não-infectados (Controles = □). O teste Cytometric beads array (CBA) foi utilizado para quantificar as concentrações de IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 E IP-10, os resultados foram expressos como valores médios $\pm$ desvio padrão de citocinas séricas (pg/mL). “*” indica o grupo de pacientes do Dia 0 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados nos indivíduos não infectados obtido através do teste T não paramétrico de *Mann Whitney* e o “#” indica o grupo de pacientes do dia 28 que apresentaram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) em comparação com os valores de referência encontrados no grupo de pacientes do dia 0 obtido através do teste T pareado não paramétrico de *Wilcoxon*.

5.4 Análise de Altos Produtores de Citocinas, Quimiocinas e Eicosanoides

Para uma caracterização mais detalhada do perfil imunológico dos pacientes com malária-vivax em relação ao grupo controle, analisamos a assinatura das citocinas, quimiocinas e eicosanoides detectados no plasma de acordo com a frequência de indivíduos caracterizados como altos e baixos produtores a partir da mediana global de cada marcador.

A **Figura 14** apresenta a assinatura dos eicosanoides estimulados com IC A23187, quando observamos o grupo controle identificamos que a frequência é maior que 50% para todos os mediadores, exceto 15-keto-PGE₂ (0%), sendo semelhante ao grupo de pacientes no D28 que apresentou frequências acima de 50%, estando abaixo apenas LTE₄ (33%), PGE₂ (0%), 15-keto-PGE₂ (8%) e 15-HETE (33%). No entanto, ao observarmos o grupo de pacientes no D0, nenhum eicosanoide apresentou frequência acima de 50%

Os nossos resultados para as citocinas e quimiocinas demonstraram que o grupo controle apresenta frequências inferiores a 50% para todos os marcadores analisados, exceto RANTES que obteve 83%. De maneira similar, no grupo de pacientes no D28 observou-se frequências inferiores a 50%, estando acima deste valor, somente o RANTES (67%) e o MIG (50%). Porém, quando observamos o grupo de Pacientes no D0, identificamos frequências superiores a 50% para IL-4 (64%), IL-6 (100%), IL-10 (100%), IFN- γ (79%), IL-17A (71%), IL-8 (86%), MIG (93%), MCP-1 (71%) e IP-10 (93%), **Figura 16**.

As **Figuras 14 e 16** representam o diagrama das frequências de altos e baixos produtores, de acordo com os mediadores analisados (eicosanoides, citocinas e quimiocinas), tendo os pontos marcados em preto, aqueles que correspondem aos valores superiores à mediana global dos respectivos analitos, e em branco, aqueles que apresentaram valores inferiores à mesma. Com intuito de ter uma representação global

dos resultados apresentados, as **figuras 15 e 17** representam em forma de gráfico de radar a dispersão dos dados expressos nas **Figuras 14 e 16**.

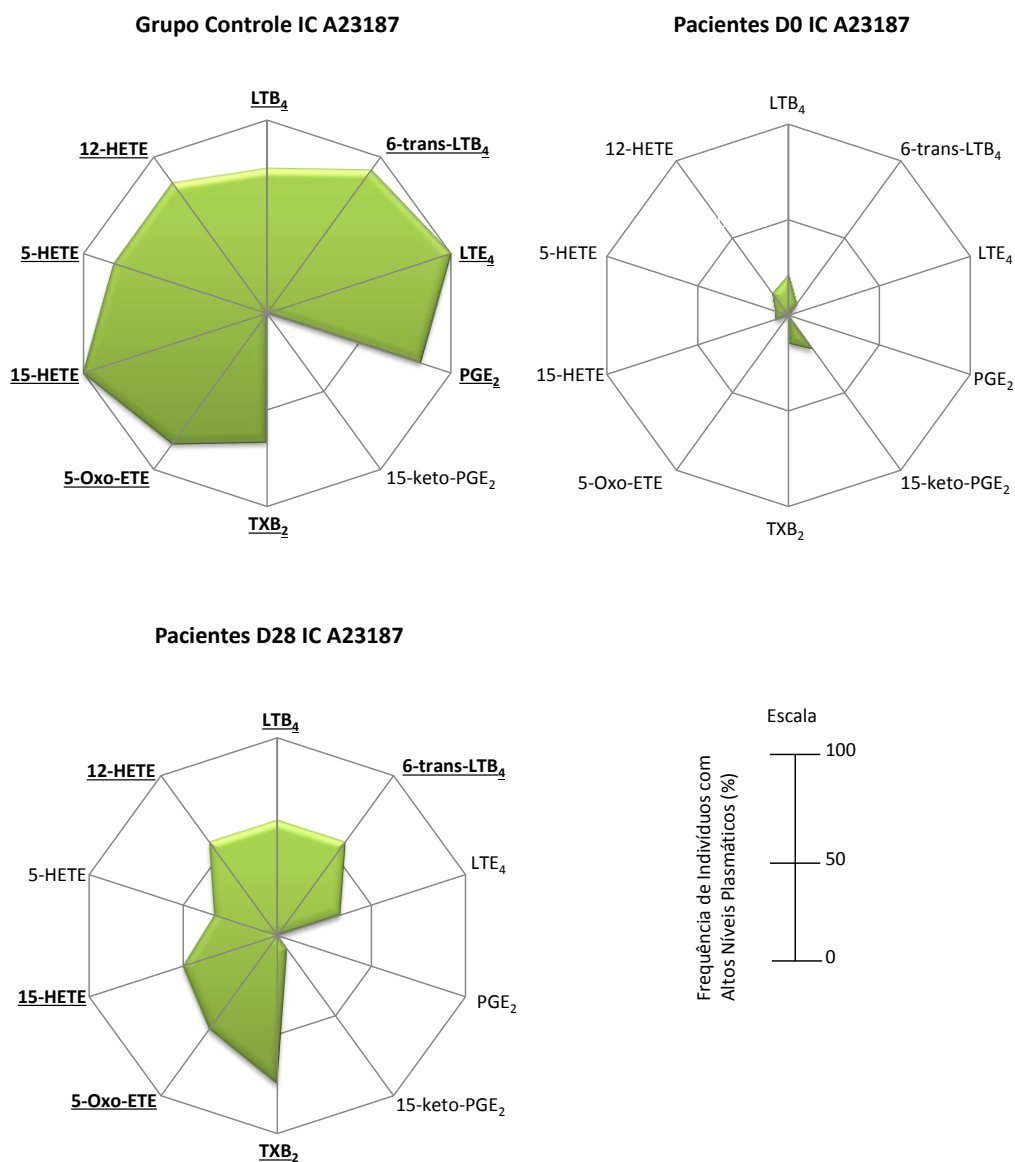


Figura 14: Representação em radar referente ao diagrama de altos e baixos produtores de eicosanoides em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com *Plasmodium vivax* estimulados *in-vitro*.

O diagrama das frequências foi projetado utilizando o valor da mediana global de cada mediador solúvel como ponto de corte para indicar a classificação dos indivíduos em altos e baixos produtores de eicosanoides estimulados com IC A23187 nos grupos de pacientes com malária D0 (fase aguda), pacientes D28 (fase de convalescença) e controle. Os pontos marcados em preto correspondem aos valores superiores à mediana global do respectivo analito, e em branco, aqueles com valores inferiores à mediana. N°: Número de Pacientes; High: N° de altos produtores; %: Porcentagem de altos produtores. Os gráficos de radar resumem a assinatura global dos eicosanoides estimulados com IC A23187, analisados nos grupos de pacientes com malária D0 (fase aguda), pacientes D28 (fase de convalescença) e controle, em que cada eixo mostra a proporção de indivíduos com concentrações elevadas de um dado mediador. Os dados relevantes ($\geq 50\%$) estão em negrito e sublinhado.

Citocinas e Quimiocinas Séricas

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ	IL-17A	IL-8	RANTES	MIG	MCP-1	IP-10
N°	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
High	0	0	1	0	0	4	4	1	10	0	4	2
%	0	0	8	0	0	33	33	8	83	0	33	17

Citocinas e Quimiocinas Séricas

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ	IL-17A	IL-8	RANTES	MIG	MCP-1	IP-10
N°	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14	14
High	1	9	14	14	4	11	10	12	1	13	10	13
%	7	64	100	100	29	79	71	86	7	93	71	93

Citocinas e Quimiocinas Séricas

	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TNF- α	IFN- γ	IL-17A	IL-8	RANTES	MIG	MCP-1	IP-10
N°	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
High	2	3	4	5	1	5	5	4	8	6	5	4
%	17	25	33	42	8	42	42	33	67	50	42	33

Figura 15: Diagrama de altos e baixos produtores de citocinas em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.

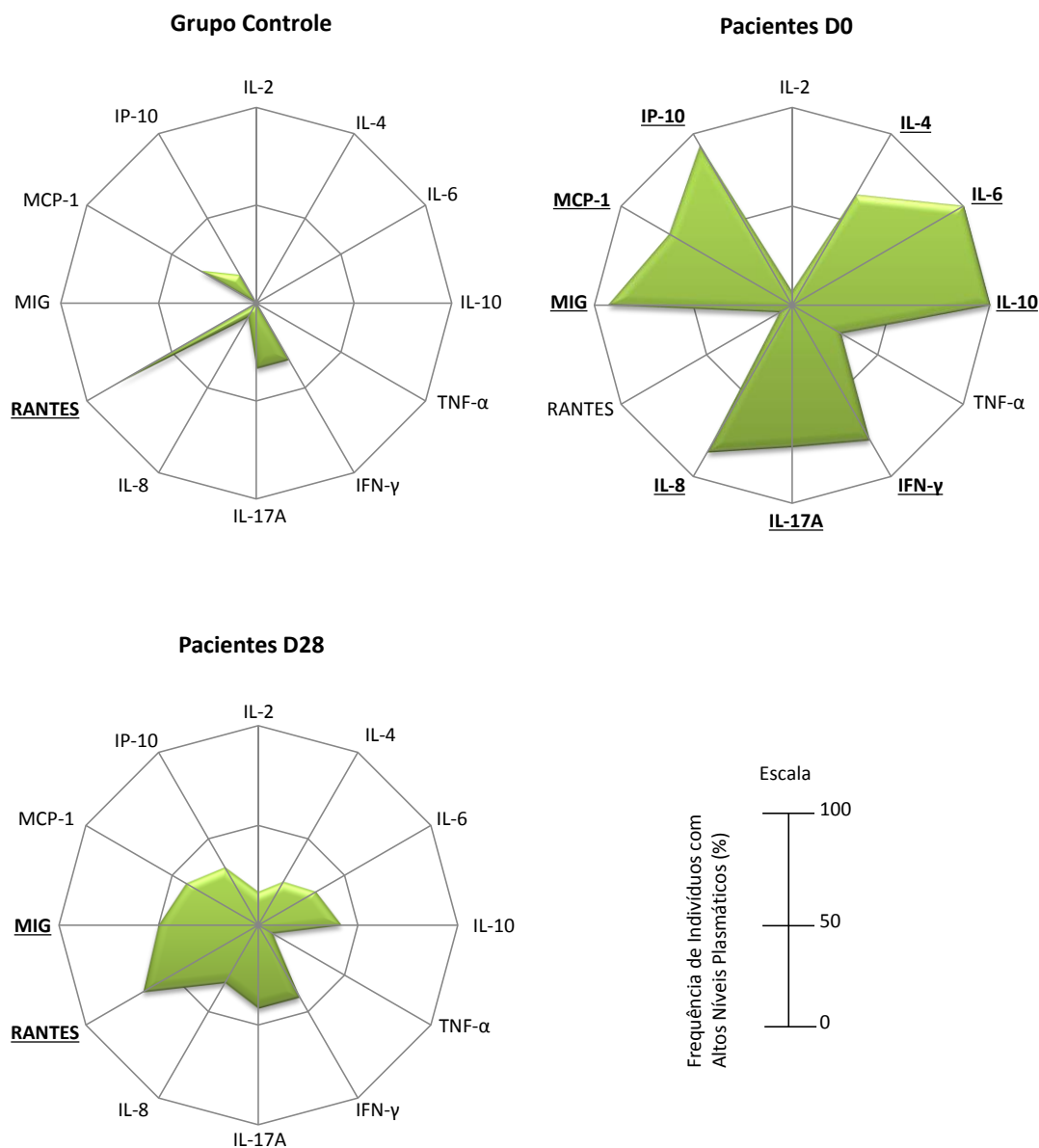


Figura 16: Representação em radar referente ao diagrama de altos e baixos produtores de citocinas em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com *Plasmodium-vivax* estimulados *in-vitro*. O diagrama das frequências foi projetado utilizando o valor da mediana global de cada mediador solúvel como ponto de corte para indicar a classificação dos indivíduos em altos e baixos produtores de citocinas e quimiocinas nos grupos de pacientes com malária D0 (fase aguda), pacientes D28 (fase de convalescença) e controle. Os pontos marcados em preto correspondem aos valores superiores à mediana global do respectivo analito, e em branco, aqueles com valores inferiores à mediana. N°: Número de Pacientes; High: N° de altos produtores; %: Porcentagem de altos produtores. Os gráficos de radar resumem a assinatura global das citocinas e quimiocinas analisados nos grupos de pacientes com malária D0 (fase aguda), pacientes D28 (fase de convalescença) e controle, em que cada eixo mostra a proporção de indivíduos com concentrações elevadas de um dado mediador. Os dados relevantes ($\geq 50\%$) estão em negro e sublinhado.

5.5 Rede de Interações entre os Mediadores Inflamatórios

As correlações apresentadas foram analisadas através do software *Cytoscape* para montagem das redes, em que pode-se observar as interações entre as citocinas, quimiocinas e eicosanoides presentes no plasma do grupo controle, pacientes D0 e pacientes D28. Foram classificadas em Positiva e negativa as interações de acordo com a intensidade (forte, moderada, fraca) da correlação determinada através do valor do coeficiente de relação (r).

A **Figura 16** demonstra as correlações estabelecidas entre citocinas, quimiocinas e eicosanoides nos grupos estudados. As correlações formadas no grupo controle foram: IL-6 com 15-HETE e 12-HETE, RANTES com MCP-1 e LTE_4 , MCP-1 com LTB_4 , 6-trans- LTB_4 , LTE_4 , 5-OXO-ETE e 5-HETE, LTB_4 com 6-trans- LTB_4 , LTE_4 , 5-OXO-ETE e 5-HETE, 6-trans- LTB_4 com LTE_4 , PGE_2 , TXB_2 , 5-OXO-ETE e 5-HETE, LTE_4 com PGE_2 , TXB_2 , 5-OXO-ETE, 5-HETE, 15-HETE e 12-HETE, PGE_2 com TXB_2 , 5-OXO-ETE, 5-HETE, 15-HETE e 12-HETE, TXB_2 com 5-OXO-ETE, 5-HETE, 15-HETE e 12-HETE, 5-OXO-ETE com 5-HETE, 15-HETE e 12-HETE e 15-HETE com 12-HETE.

Quando comparamos o grupo de pacientes infectados no D0 com o grupo controle, as novas correlações obtidas foram: IL-2 com $\text{TNF}\alpha$, IL-4 com IL-8, MCP-1 e IP-10, IL-6 com IL-10, IFN- γ , IL-8, MCP-1 e IP-10, IL-10 com IL-8, MCP-1 e IP-10, IFN- γ com IL-8, IP-10, LTB_4 , 6-trans- LTB_4 , 5-OXO-ETE, 5-HETE e 12-HETE, IL-8 com MCP-1, IP-10, TXB_2 e 12-HETE, MIG com IP-10, TXB_2 e 12-HETE, MCP-1 com IP-10, porém, houve a perda de correlações entre RANTES com MCP-1, MCP-1 com LTB_4 e 6-trans- LTB_4 , 6-trans- LTB_4 com TXB_2 , TXB_2 com 5-Oxo-ETE, 5-HETE e 15-HETE e 5-Oxo-ETE com 15-HETE e 12-HETE.

Os pacientes que retornaram no dia 28 apresentaram novas correlações quando comparados com o grupo de pacientes no D0: IL-2 com IL-4, IL-6 e RANTES, IL-4 com $\text{TNF}\alpha$, IL-6 com RANTES, IFN- γ com 15-HETE, MCP-1 com 15-HETE, IP-10 com LTB_4 , 15-HETE e 12-HETE, LTB_4 com LTE_4 , 15-HETE e 12-HETE, 6-trans- LTB_4 com 12-

HETE, LTE_4 com 5-OXO-ETE, 5-OXO-ETE com 15-HETE e 12-HETE, 5-HETE com 12-HETE e 15-HETE com 12-HETE. No Entanto, houve perda de correlações entre: IL-4 com IL-8, MCP-1 e IP-10, IL-6 com IL-10, IFN- γ , IL-8, MCP-1 e IP10, IL-10 com IL-8 e IP-10, IFN- γ com IL-8, IL-8 com MCP-1, IP-10, TXB_2 , e 12-HETE, MIG com IP-10, TXB_2 e 12-HETE, MCP-1 com IP-10 e TXB_2 com 12-HETE.

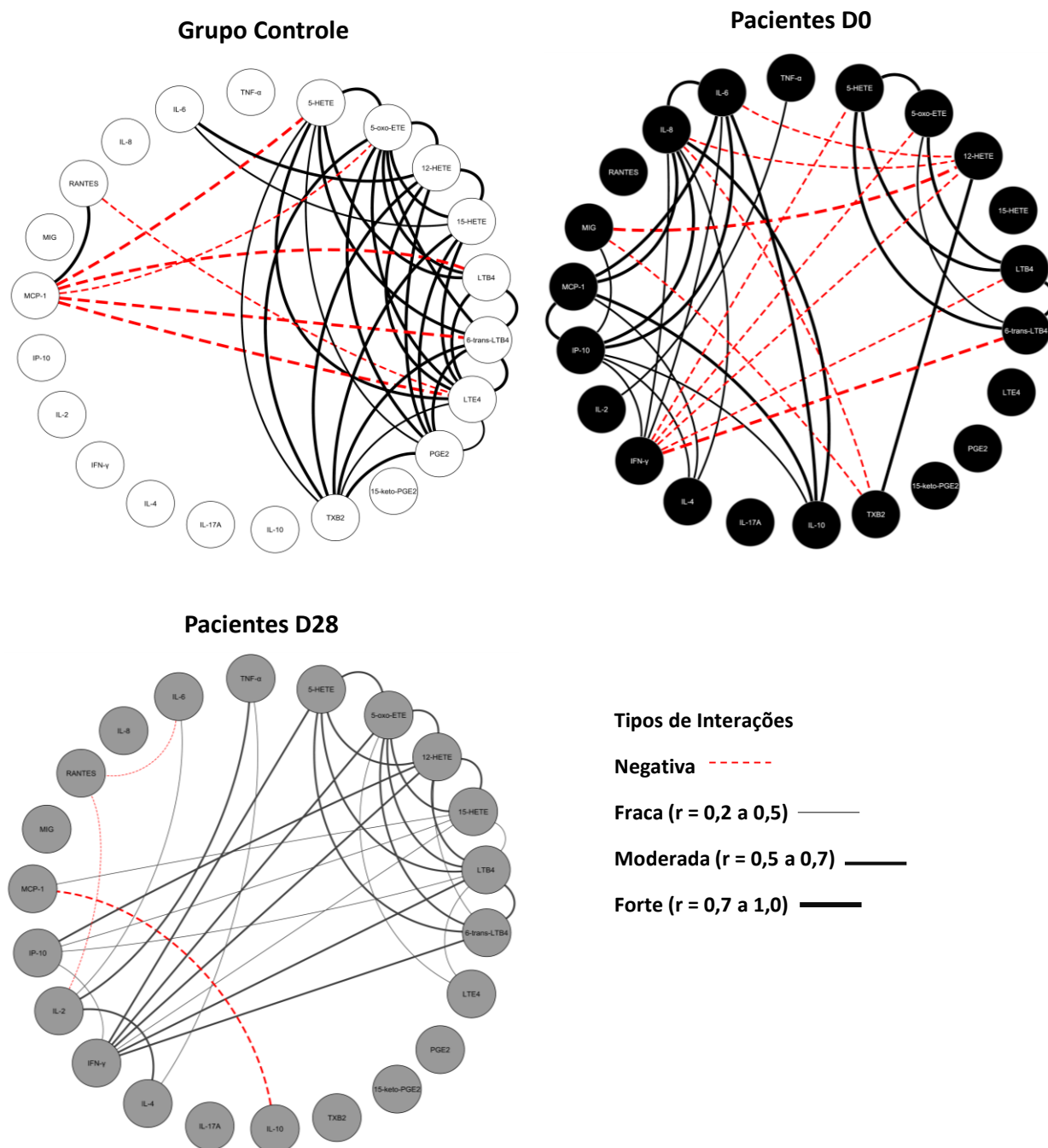


Figura 17: Rede de interação entre eicosanoides, citocinas e quimiocinas em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com *Plasmodium vivax*.

As interações de LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTE₄, PGE₂, 15-keto-PGE₂, TXB₂, 5-Oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10 foram analisadas no grupo controle grupo de pacientes D0 e grupo de pacientes D28. Cada linha de ligação representa uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre um par de mediadores, as linhas tracejadas de vermelho representam correlações negativas. As linhas pretas contínuas representam correlações positivas e o grau de significância é representada por a espessura da linha.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A Malária é caracterizada por uma Síndrome Febril Aguda decorrente de um processo patogênico diferenciado dependente de peculiaridades inerentes ao hospedeiro e ao parasita, sendo o aparecimento de uma resposta inflamatória sistêmica, resultando em produção de citocinas e quimiocinas e levando ao recrutamento de células de defesa e a resposta imunes inata e adaptativa, havendo um balanço entre os mediadores pró- e anti-inflamatórios que é essencial para os resultados clínicos na malária (CLARK *et al.*, 2006).

No presente trabalho, buscamos expor as características clínico-epidemiológico-laboratoriais e imunológicas de pacientes infectados por *Plasmodium vivax* que não haviam iniciado o tratamento proposto pelo Ministério da Saúde (D0), além de comparar estes dados com os dados laboratoriais e imunológicos de indivíduos que não apresentavam a doença, sendo considerados saudáveis (controles), e dos mesmos pacientes no seu período de convalescença (D28), após tratamento e possível cura da doença, a fim de descrever e caracterizar o perfil de resposta destes pacientes frente a infecção.

6.1 Características clínico-epidemiológicas e laboratoriais

Segundo estudos anteriores, a maioria dos pacientes infectados são adultos, do sexo masculino, podendo estar relacionado com uma maior exposição desses indivíduos à picada do mosquito devido ao trabalho em áreas rurais (FERNANDES *et al.*, 2008). Estes dados corroboram com os dados obtidos no nosso trabalho visto que a população estudada apresentou média de idade em torno de 40 anos.

A sintomatologia apresentada pelos pacientes não diferiu da sintomatologia clássica da doença, caracterizada por febre intermitente, calafrios e cefaleia e pelos sintomas prodrômicos – mialgia, náuseas, vômitos, artralgia etc. –, comuns a todas as doenças febris descritas por Costa *et al.*, (2010). Apesar do nosso estudo não ter incluído em sua amostragem pacientes diagnosticados com quadro de malária grave por *P. vivax*,

estudos recentes já demonstraram a ocorrência dos mesmos (GENTON *et al.*, 2008; LACERDA *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2015), sendo ainda este fato relacionado por alguns, quando falamos de áreas não endêmicas, com a demora de diagnóstico relacionada às semelhanças do mesmo com qualquer outro quadro febril agudo (COSTA *et al.*, 2010).

A malária por ser considerada uma doença hematológica, ela pode afetar quase todos os componentes sanguíneos (LACERDA *et al.*, 2011). Ao analisarmos trabalhos anteriores publicados, pudemos observar que são dados como principais sinais de complicação desta patologia, os quadros anêmicos e plaquetopênicos (ALEXANDRE *et al.*, 2010; LACERDA *et al.*, 2012). No entanto, os pacientes estudados neste trabalho apresentaram uma diminuição significativa do hematócrito, leucócitos totais e no número de plaquetas quando comparados aos indivíduos controles. Ao contrário da infecção por *P. falciparum*, onde a principal causa da anemia é a própria hemólise, estudos relatam que a principal causa da mesma na infecção por *P. vivax* seja a resposta inflamatória exacerbada (GELETA E KETEMA, 2016).

As alterações nos parâmetros laboratoriais associado à doença, já são bem conhecidos, contudo, as alterações específicas podem variar de acordo com a gravidade da doença, estado nutricional, fatores demográficos e com a imunidade do hospedeiro (PRICE *et al.*, 2001). Apesar da ampla evidência sobre as alterações lipídicas na infecção por *P. falciparum* (BAPTISTA *et al.*, 1996) pouco se sabe na infecção por *P. vivax* (KRISHNA *et al.*, 2009).

Um estudo realizado em Cuiabá mostrou que pacientes infectados com *P. vivax* na fase aguda da doença possuíam concentrações baixas de colesterol total, HDL e LDL e apresentava aumento no triglicerídeo. Na fase de convalescença, os valores voltavam a sua normalidade (MESQUITA *et al.*, 2016), confirmando similaridade com os nossos resultados. Para fração de VLDL o trabalho de Krishna *et al.*, (2009) apresentou valores semelhantes ao nosso na infecção por *P. vivax*.

A glicose foi outro parâmetro bioquímico avaliado e que se apresentou aumentada no momento da infecção. Este aumento pode estar relacionado a incapacidade do *Plasmodium* para armazenar energia sob a forma de glicogênio e depender de uma fonte exógena de glicose como fonte de nutriente (HUMEIDA *et al.*, 2011).

O ácido úrico é uma molécula altamente inflamatória, o seu precursor é a hipoxantina sendo esse metabólito, essencial para o crescimento e amadurecimento do plasmódio, no qual o mesmo metaboliza essa molécula transformando-a em xantina que é considerada o verdadeiro precursor do ácido úrico (GALLEGO-DELGADO *et al.*, 2014). Lopera-Mesa *et al.*, (2012) detectaram concentrações normais de ácido úrico na corrente sanguínea em pacientes não graves infectados com *P. falciparum* divergindo dos resultados obtidos em nosso estudo cuja concentração se mostrou levemente diminuída quando comparada com o grupo controle.

Avaliando outros parâmetros renais, Arévalo-Herrera *et al.*, (2015) mostraram que pacientes não graves infectados com *P. vivax* apresentavam elevações moderadas, porém concentrações normais de uréia e creatinina, corroborando assim com os nossos resultados.

Além disso, observou-se que as concentrações de fosfatase alcalina, TGO, TGP e frações de bilirrubinas (total, direta e indireta), apresentaram-se elevadas na fase aguda da doença (D0) e que essas concentrações voltavam a sua normalidade no período de convalescença (D28), semelhantes aos resultados encontrados por Tangpukdee *et al.*, (2006). Entretanto, nos trabalhos publicados por Shah *et al.*, (2009) e Asma *et al.*, (2014) foram observadas desregulações hepáticas somente na fase aguda da doença, sugerindo que seja por causa das lesões que o fígado esteja sofrendo durante o percurso da doença.

6.2 Perfil de Citocinas

As citocinas pró-inflamatórias e regulatórias apresentam um papel importante na resposta imune contra a malária, o equilíbrio entre a produção das mesmas pode

determinar o perfil imunológico para combater o patógeno no hospedeiro (GIRIBALDI *et al.*, 2010).

Em nosso estudo, os resultados das concentrações de citocinas IL-2, IL-4 e TNF- α nos pacientes no D0 não apresentaram significância estatística quando comparados com o grupo controle e 28 dias após o tratamento com antimalárico. Este resultado pode estar relacionado à forma grave da doença. Contudo, observou-se um aumento significativo dessas citocinas nas infecções por *P. vivax* em estudos feitos no Japão e no Brasil (BAKIR *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2013; RODRIGUES-DA-SILVA *et al.*, 2014).

Além disso, foi observado um aumento significativo das citocinas IL-6, IL-10 e IFN- γ em pacientes infectados pelo *Plasmodium vivax* no D0 quando comparamos com o grupo controle e com o grupo no D28. O mesmo foi observado em estudos feitos com *P. vivax* e *P. falciparum* em Belém, Roraima, Toronto e Moçambique (MEDINA *et al.*, 2011; MACMULLIN *et al.*, 2012; ROVIRA-VALLBONA *et al.*, 2012; RODRIGUES-DA-SILVA *et al.*, 2014).

A IL-17A também apresentou-se aumentada no D0 quando comparada com o grupo controle. O mesmo foi encontrado em estudos feitos por Bueno *et al.*, 2012 com *Plasmodium vivax* e Herbert *et al.*, 2015 com *Plasmodium falciparum*. Acredita-se que a IL-17A esteja relacionada com a expansão de células T CD4⁺ associadas com o perfil de citocinas pro- inflamatórias na malária não complicada. Contudo, sabe-se muito pouco sobre sua influência no curso da doença (BUENO *et al.*, 2012).

6.3 Perfil de Quimiocinas

A IL-8 é uma quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos quando existem processos inflamatórios no organismo. Seu envolvimento na patogênese da malária ainda não está bem esclarecido, porém, inúmeros trabalhos já demonstram a relação desta quimiocina com seu quadro infeccioso. Trabalhos realizados com pacientes adultos evidenciaram um aumento significativo dos níveis séricos da mesma tanto em

infecção por *P. falciparum*, quanto por *P. vivax* (YILDIZ ZEYREK *et al.*, 2006; BERG *et al.*, 2014).

No trabalho realizado por Wangala *et al.*, (2015) envolvendo pacientes, tanto adultos quanto crianças, infectados por *P. falciparum* os níveis séricos de IL-8 encontrados foram diferentes entre os dois grupos de pacientes, havendo redução significativa dos níveis séricos nos adultos com quadro não grave e altos níveis nas crianças graves e não graves. Quando comparados os níveis séricos da IL-8 nos pacientes antes e após o tratamento, observou-se uma redução da mesma após a cura (DE SOUZA LEORATTI *et al.*, 2012). Em nossa pesquisa, os pacientes apresentaram níveis séricos mais elevados de IL-8 no D0, quando comparado ao controle e ao D28, sugerindo um papel importante desta quimiocina no processo inflamatório desencadeado na malária *vivax*.

MIG e IP-10 são quimiocinas da família CXC envolvidas no recrutamento de células T efectoras para o local da inflamação. Em estudos prévios sobre a presença de MIG em quadros de malária, tanto em camundongos quanto em crianças, observou-se aumento dos níveis cerebrais e séricos da mesma, respectivamente, corroborando com os nossos achados (AYIMBA *et al.*, 2011; LACERDA-QUEIROZ *et al.*, 2011; BOSTRÖM *et al.*, 2012). Sabe-se que esta quimiocina está correlacionada positivamente com a densidade parasitária em infecção por *P. falciparum* em crianças, podendo MIG servir dessa forma como marcador da multiplicação do parasita e da redução da carga parasitária (AYIMBA *et al.*, 2011). Quanto a IP-10, os níveis séricos desta quimiocina mostraram-se elevados em diversos estudos anteriores (BOSTRÖM *et al.*, 2012; WANGALA *et al.*, 2015; DIEYE *et al.*, 2016) e os mesmos já foram comprovadamente associados à severidade da doença (BERG *et al.*, 2014) e ao risco de malária cerebral fatal (ARMAH *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2011). Contudo, foi observado um aumento nas concentrações séricas desta quimiocina no D0 nos pacientes estudados nesta pesquisa.

A Proteína Quimiotática de Monócitos (MCP-1), da família CC de quimiocinas, é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, células endoteliais e atuam no

recrutamento de monócitos para os locais de infecção ou lesão tecidual (PALOMINO E MARTI, 2015).

Em estudos anteriores, observou-se que pacientes diagnosticados com *P. falciparum* apresentaram um aumento significativo de MCP-1 quando comparados com os controles saudáveis (BERG *et al.*, 2014), não havendo diferença estatística desses valores quando comparados os casos de *P. vivax* aos de *P. falciparum* (FERNANDES *et al.*, 2008). MCP-1 mostrou-se ainda como um fator de indução de insuficiência renal aguda (IRA) como complicação da infecção (DALKO *et al.*, 2015). Apesar de não avaliarmos casos de malária grave, nossos pacientes mostraram elevação dos níveis séricos de MCP-1 quando comparados os pacientes no D0 com D28 e com os controles.

A RANTES é uma citocina quimioatraente capaz de fazer o recrutamento de monócitos, células T-helper de memória e eosinófilos. Na infecção por malária, níveis baixos desta quimiocina foram associados à infecção (BOSTRÖM *et al.*, 2012), sendo ainda valores muito baixos da mesma associada à gravidade da doença, independente da contagem de plaquetas (JOHN *et al.*, 2006). Estes dados corroboram com nossos achados em pacientes com *P. vivax*, no qual também houve redução significativa dos níveis séricos de RANTES dos pacientes no D0 comparados com os controles e os valores dos pacientes no D28. Isto pode estar relacionado com a fase de convalescença pós-tratamento, que ocorre no D28.

Podemos observar que todos os valores quantificados durante o estudo no D28 estavam próximos aos valores dos indivíduos controles, inferindo que, após a resolução da doença, todos os aspectos clínico-laboratoriais e imunológicos dos pacientes retornaram para seus parâmetros considerados normais.

6.4 Perfil de Eicosanoides

Os eicosanoides são mediadores lipídicos de sinalização local, derivados do ácido araquidônico, tendo sua participação nos processos homeostáticos e inflamatórios

(FUNK, 2001; BUCZYNSKI *et al.*, 2009). Para identificação, quantificação e monitoração desses eicosanoides tem se usado a técnica de lipidoma através do aparelho de espectrometria de massa (DUMLAO *et al.*, 2011; HARKEWICZ E DENNIS, 2011).

As três principais vias de metabolização para produção dos eicosanoides são: a via da cicloxigenase (COX-1 e COX-2) que produz as prostagandinas (PGs) e tromboxanos (TXs); a via da lipoxigenase (5-LO, 12-LO e 15-LO) produzindo os leucotrienos (LTs), lipoxinas (LPs), hepoxilinas e os ácidos hidroxi-eicosatetraenóicos (HETEs); e a via citocromo P450 (CYP450) que produz os ácidos epoxi-eicosatrienoico (EETs), ácidos dihidroxi-eicosatrienoico (DiHETEs) e HETEs (TAM, 2013)

As principais células que produzem eicosanoides são basófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos, monócitos e neutrófilos. Embora vários tipos de células sintetizem esses mediadores (FUNK, 2001). O IC A23187 é conhecido como um potente indutor de eicosanoides, pois ele tem a capacidade de aumentar os canais de cálcio nas células, fazendo com que aumente a concentração de cálcio no citoplasma e ocorra a translocação de fosfolipase A₂ citosólica para o núcleo havendo assim a liberação do ácido araquidônico que é rapidamente metabolizado pelas vias de metabolização citadas, resultando assim na produção dos metabólitos (BORGEAT E SAMUELSSON, 1979a; FLAMAND *et al.*, 2002; ZARINI *et al.*, 2006; TANAKA *et al.*, 2014).

Moléculas quimioatraentes tais como o LTB₄, exercem função tanto na migração de leucócitos para sites de inflamação *in vivo*, quanto na ativação das mesmas células que foram recrutadas para matar o microrganismo invasor de uma maneira oxido nítrico dependente (TALVANI *et al.*, 2002).

Estudo realizado por Xiao *et al.*, (1999) mostrou que camundongos infectados com *Plasmodium berghei* produziam altas concentrações de LTB₄ e que a mesma se mostrou prejudicial na patogênese da malária cerebral. No entanto, no presente estudo

foi demonstrado uma redução significativa nas concentrações séricas de LTB₄ no grupo de pacientes D0 quando comparados com o grupo controle e um aumento significativo desse metabólito no grupo de pacientes D28 em relação aos pacientes D0. Contudo, sabe-se que os pacientes deste estudo fizeram uso de paracetamol/dipirona, anti-inflamatório não esteroidal, que inibe a via do AA, e que, possivelmente, pode estar relacionada com a diminuição de LTB₄ no D0.

Já na leishmaniose causada por *Leishmania amazonenses* o LTB₄ desempenhou papel importante, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, no controle da resistência / suscetibilidade à infecção (SEREZANI *et al.*, 2006). Trabalhos desenvolvidos com outros parasitas (*Histoplasma capsulatum* e *Strongyloides venezuelensis*) mostraram que o LTB₄ em altas concentrações, atua como fator protetor na infecção e como importante controlador da parasitemia (MEDEIROS *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2005). Este também se mostrou protetor durante infecção por *Micobacterium tuberculosis* (PERES-BUZALAF *et al.*, 2011).

A síntese de 6-trans-LTB₄ que é um composto relativamente inativo em comparação ao LTB₄ e ocorre pela hidrólise não enzimática de LTA₄ ou pela decomposição oxidativa de CysLTs, na presença de mieloperoxidase e ácido hipocloroso, mas a importância fisiológica deste mecanismo ainda não está bem estabelecida. Porém, tem sido descritas funções quimioatrativas em neutrófilos (BORGEAT E SAMUELSSON, 1979b; LEE *et al.*, 1983; FRETLAND *et al.*, 1991). Apesar desse mediador não ter sido descrito tanto em outros trabalhos sobre doenças infecciosas quanto de outras patologias, em nosso trabalho o mesmo foi observado uma diminuição no D0 quando comparado com o D28 e grupo controle.

Os CysLTs (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) são produzidos a partir da LTC₄ sintase, no qual o LTC₄ é convertido extracelularmente em LTD₄ e LTE₄, através da remoção sequencial de aminoácidos. A LTE₄ é a mais estável das CysLTs e pode ser medida após a excreção na urina; LTE₄ urinária é frequentemente utilizado como um marcador de síntese de leucotrienos do 'corpo inteiro' , está intimamente relacionado com a asma e

ao processo alérgico da rinite, possuem função de broncoconstrição, derrame vascular e extravasamento de neutrófilos atuando nos receptores CysLT1 e CysLT2 presente nas células (SAMUELSSON, 1983; MITA *et al.*, 2001; BORISH, 2003; MELLOR *et al.*, 2003; STEINKE E BORISH, 2004; CORRIGAN *et al.*, 2005; GAUVREAU *et al.*, 2005).

No trabalho desenvolvido por Trindade *et al.*, (2014), detectou-se a produção de CysLTs na infecção por *Clostridium difficile* em camundongos, porém os mesmos não foram responsáveis por induzir a colite. Já na infecção por HTLV em humanos Trindade *et al.*, (2012) descobriram altas concentrações de CysLTs, e que esses resultados poderiam contribuir para que os pacientes pudessem ter uma maior predisposição a desenvolver a mielopatia/paraparesia espástica tropical associada ao HTLV-I (HAM/TSP). Porém, nossos resultados discordam dos trabalhos citados pois detectou-se LTE₄ na fase de convalescença em níveis semelhantes aos valores observados no grupo controle.

A PGE₂ é um produto derivado da via de COX participando tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa e esse metabólito possui diversas funções como: vasodilatação, permeabilidade vascular, aumento da concentração de IL-10 e diminuição da concentração de TNF, estando também associado com a hiperalgesia e febre (BRAY *et al.*, 1981; SHINOMIYA *et al.*, 2001; TREFFKORN *et al.*, 2004; SUGIMOTO E NARUMIYA, 2007).

Em nosso trabalho não obtivemos concentrações detectáveis de PGE₂ no grupo de pacientes infectados com *P. vivax*, divergindo dos dados encontrados por Perkins *et al.*, (2001) que foi observado que crianças infectadas com *P. falciparum* produziam menores concentrações de PGE₂ quando comparados com o grupo controle, sugerindo que a PGE₂ tem um papel protetor para o hospedeiro infectado, e que essa redução poderia ocorrer através da liberação dos produtos do parasita (β hematina e hemozoina) ou o uso de antipiréticos porque ambos inibem a via de COX-2 e consequentemente a produção desse mediador pode ser suprimida, sugerindo assim, que altas concentrações de PGE₂ possam estar envolvidas no agravamento da doença.

(KELLER *et al.*, 2004; PERKINS *et al.*, 2005; KELLER *et al.*, 2006; ANYONA *et al.*, 2012).

Porém no grupo de pacientes infectados com *P. vivax* do nosso estudo, foi detectado o 15-keto-PGE₂ que é o principal metabólito degradado da PGE₂, presente no plasma. A produção do mesmo ocorre através das enzimas de 15-PGDH hidroxí e 15-oxo-PG Δ 13-redutase. Essa substância está presente no plasma humano nas concentrações de aproximadamente, 10 a 100 pg/mL (FITZPATRICK *et al.*, 1980; BOTHWELL *et al.*, 1982), sendo semelhante com o que foi encontrado em nosso trabalho. Podem possuir a função de aumentar a adipogênese e a secreção de bicarbonato e diminuir a retenção de muco (CHOU *et al.*, 2007). No entanto, não há relatos na literatura, desse metabólito envolvidos em infecções parasitárias.

Outro mediador produzido pela via de COX é o TXB₂, que é um metabolito estável, biologicamente inativo, formado a partir da hidrólise não-enzimática de TXA₂ (NEEDLEMAN *et al.*, 1976). Sua detecção no plasma humano reflete uma estimativa de TXA₂ sistêmico (LAWSON *et al.*, 1986; PATRONO *et al.*, 1986). Evidências sugerem que esse eicosanoide está associado com o aumento da agregação plaquetária, a indução da vasoconstrição e a redução de células T ativadas, (HARTWIG *et al.*, 1995; COGOLLUDO *et al.*, 2003; KABASHIMA *et al.*, 2003).

O Trabalho publicado por Obata *et al.*, (2002) mostrou que pacientes infectados com *P. falciparum* apresentavam concentrações diminuídas de TXB₂ quando comparados com o grupo controle. Esta redução pode estar relacionada com plaquetopenia durante a infecção. Porém, em nosso estudo essas concentrações voltaram a aumentar durante o período de convalescença, sugerindo que esse aumento esteja associado ao restabelecimento dos níveis normais de plaquetas, concordando com os resultados observados neste estudo.

A via da LOX é derivada a partir da metabolização de AA e está envolvida na síntese de leucotrienos e lipoxinas, participando das atividades imunes e anti-inflamatórias, três

enzimas controlam essa via: A 5-LOX que é produzida por neutrófilos, a 12-LOX que é produzida por plaquetas e a 15-LOX que se faz presente nos macrófagos e endotélio. A 15-LOX é altamente induzível e produz os HETEs. Curiosamente, o 15-HETE é um forte inibidor de eicosanoides pro-inflamatórios no entanto o 5-HETE e 12-HETE são potentes quimiotrativos de granulócitos e também estimulam a vasodilatação através da síntese de PG. Quando 5-HETE é metabolizado para 5-Oxo-ETE irá possuir forte quimioatração de esinófilo, apresentando-se mais potente que o LTB₄ (DODGE E THOMAS, 1985; POWELL *et al.*, 1992; SCHWENK E SCHRÖDER, 1995).

Os trabalhos produzidos por Green MD *et al.*, (1996) e Carter MD *et al.*, (2007) demonstraram que culturas de células expostas ao produto do parasita do *plasmodium* e *Schistosoma spp*, produziram hemozoina em concentrações de 5,15 e 12-HETE, respectivamente, sugerindo que esses eicosanoides possam contribuir para a fisiopatologia da doença associado a malária grave e cerebral. Além disso, pode estar relacionado com a modulação da resposta imune inata, desempenhando um papel potencial na patogénese da esquistossomíase. Corroborando assim aos nossos resultados que também apresentaram esses três ácidos hidroxi-eicosatetraenoico em pequena quantidade durante a fase inicial da doença.

O mediador degradado de 5-HETE (5-Oxo-ETE) também apresentou concentrações detectáveis em nosso trabalho, porém não há relatos do mesmo na literatura envolvendo doenças infecciosas, entretanto o mesmo se apresenta em outras patologias como câncer, sinusite entre outras (O'FLAHERTY *et al.*, 2005; STEINKE, 2006).

6.5 Correlações dos Mediadores Solúveis

Para determinar a interação do perfil de eicosanoides com citocinas e quimiocinas na malária *vivax* foram realizadas análises de rede, a fim de observar possíveis interações imunológicas que possam ajudar nos entendimentos sobre a patogénese da malária *vivax*.

Segundo dados publicados por Meslier *et al.*, (1992), observou-se que houve um aumento na produção dos metabólitos derivados de 5-LOX em culturas de células de pulmão de camundongos estimuladas com IFN- γ e IC A23187, sugerindo uma melhor amplificação local da resposta inflamatória por efeitos do IFN- γ e derivados da 5-Lipoxigenase. Estes dados discordam dos nossos achados, visto que no grupo de pacientes infectados com *P.vivax*, no D0 foi observada altas concentrações de IFN- γ e níveis baixos dos derivados de 5-lipoxigenase (5-HETE, 5-Oxo-ETE, LTB₄ e 6-trans-LTB₄).

Todavia, no grupo de pacientes no D28 foi observado uma correlação positiva entre as concentrações séricas de IFN- γ e derivados da 5-Lipoxigenase demonstrando um restabelecimento progressivo da doença. Não obstante, a correlação deixa de ser evidenciada quando comparamos com o grupo controle. Estes resultados demonstram que, possivelmente, existe uma tendência que estas correlações deixem de existir com o decorrer dos dias de restabelecimento da resposta imune.

A MCP-1 é uma quimiocinas que possui a capacidade de liberar produtos da 5-LOX em um ambiente inflamatório em modelo murino de aterosclerose crônica (SILVA *et al.*, 2002), porém em nosso trabalho não foram observadas essas interações nos grupos de pacientes no D0 e D28, em virtude dos pacientes aqui estudados estarem na fase aguda da infecção.

Wen *et al.*, (2007) demonstrou em um estudo *in vivo* e *in vitro* que produtos derivados de 12-LOX e 15-LOX aumentavam a produção das citocinas IL-6 e TNF- α sugerindo que as produções das mesmas estivessem intimamente ligadas, possuindo um papel importante na ativação da inflamação crônica. Essa relação pode ser vista em nosso grupo controle somente para a IL-6. Quando analisamos essa interação no grupo de pacientes no D0 essa interação só permanece entre IL-6 e 12-HETE, havendo a perda da interação com 15-HETE. No grupo de pacientes no D28 essa correlação é completamente perdida.

O 15-HETE aumenta a produção de MCP-1, desenvolvendo um papel na ativação de plaquetas e sugerindo uma possível trombose vascular pulmonar (SHEN *et al.*, 2015). Essa interação não se apresenta no grupo de pacientes no D0, porém há uma interação moderada no grupo de pacientes no D28, que pode estar relacionada com o aumento de plaquetas.

Conclusão

CONCLUSÃO

Muitos estudos estão sendo realizados para tentar elucidar mecanismos desenvolvidos pelo sistema imune do hospedeiro e que se fazem presentes durante a infecção contra *Plasmodium vivax*. Ao final deste trabalho concluiu-se que:

- Pacientes com malária *vivax* podem apresentar alterações hematológicas significativas sem desenvolverem a forma grave da doença;
- As Alterações significativas em alguns parâmetros bioquímicos indicam possível dano hepático causado pelo parasita;
- Dos 22 eicosanoides estudados em nosso trabalho houve a presença de 10 metabolitos (LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTE₄, PGE₂, 15-keto-PGE₂, TXB₂, 5-Oxo-ETE, 5-HETE, 12-HETE e 15-HETE), sugerindo a participação dos mesmos no processo inflamatório ocasionado pela infecção *Plasmodium vivax*;
- Dentre os perfis de citocinas e quimiocinas estudados, as concentrações IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A, IL-8, RANTES MIG, MCP-1 e IP-10 caracterizam um perfil inflamatório, regulatório e quimiotático ativo durante a fase aguda da doença;
- As citocinas IL-6 e IFN- γ e as quimiocinas IL-8, RANTES MIG, MCP-1 e IP-10 apresentaram correlação com todos os eicosanoides identificados, sugerindo a participação dos mesmos durante a resposta imunológica.

Referências

REFERÊNCIAS

- Acosta-Rodriguez, EV; Napolitani, G; Lanzavecchia, A; Sallusto, F. **Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nat Immunol.* 8: 942-949, 2007.
- Adalid-Peralta, L; Fragoso, G; Fleury, A; Sciutto, E. **Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections.** *Int J Biol Sci.* 7(9): 1412-1426, 2011.
- Alexander, N; Schellenberg, D; Ngasala, B; Petzold, M; Drakeley, C; Sutherland, C. **Assessing agreement between malaria slide density readings.** *Malaria journal.* 9(1): 1, 2010.
- Alexandre, MA; Ferreira, CO; Siqueira, AM; Magalhaes, BL; Mourao, MP; Lacerda, MV; Alecrim, MG. **Severe plasmodium vivax malaria, Brazilian Amazon.** *Emerg Infect Dis.* 16(10): 1611-1614, 2010.
- Alves, FP; Gil LH; Marrelli MT; Ribolla PE; Camargo EP; da Silva LH. **Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon.** *J Med Entomol.* 42(5): 777-779, 2005.
- Angulo-Guerrero, O & Oliart, RR. **Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on adenylate cyclase, 5'nucleotidase and Na⁺ K (+)-ATPase activities in rat brain-plasma membrane.** *Archivos latinoamericanos de nutricion.* 48(4); 293-298, 1998.
- Anyona, SB; Kempaiah, P; Raballah, E; Davenport, GC; Were, T; Konah, SN; Perkins, DJ. **Reduced systemic bicyclo-prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia.** *American journal of hematology.* 87(8): 782-789, 2012.

- Arévalo-Herrera, M; Lopez-Perez, M; Medina, L; Moreno, A; Gutierrez, JB; Herrera, S. **Clinical profile of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in low and unstable malaria transmission settings of Colombia.** *Malaria jornal.* 14(1): 1, 2015.
- Arévalo-herrera, M; Valencia, AZ; Vergara, J; Bonelo, A; Fleischhauer, K; Gonzalez, JM; Restrepo, JC; Lopez, JÁ; Valmori, D; Corradin, G; Herrera, S. **Identification of HLA-A2 restricted CD8(+) Tlymphocyte responses to Plasmodium vivax circumsporozoite protein in individuals naturally exposed to malaria.** *Parasite Immunol.* 24: 161-169, 2002.
- Armah, HB; Wilson, NO; Sarfo, BY; Powell, MD; Bond, VC; Anderson, W; Tongren, JE. **Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children.** *Malaria Journal.* 6(1): 1, 2007.
- Artavanis-Tsakonas, K & Riley, EM. **Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum infected erythrocytes** *J Immunol.* 169: 2956-2963, 2002.
- Artavanis-Tsakonas, K; Tongren, JE; Riley, EM. **The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology.** *Clin Exp Immunol.* 133(2): 145-152, 2003.
- Asma, UE; Taufiq, F; Khan, W. **Prevalence and clinical manifestations of malaria in Aligarh, India.** *The Korean journal of parasitology.* 52(6): 621, 2014.
- Ayimba, E; Hegewald, J; Segbena, AY; Gantin, RG; Lechner, CJ; Agossou, A; Soboslay, PT. **Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria.** *Clinical & Experimental Immunology.* 166(2): 218-226, 2011.
- Baird, JK; Jones, TR; Danudirgo, EW; Annis, BA; Bangs, MJ; Basri, H; Purnomo, Masbar, S. **Age-dependent acquired protection against Plasmodium falciparum in people having two years exposure to hyperendemic malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 45: 65-76, 1991.

- Bakir, HY; Tomiyama, C; Abo, T. **Cytokine profile of murine malaria: stage-related production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines.** *Biomedical Research*. 32(3): 203-208, 2011.
- Baptista, JL; Vervoort, T; Van der Stuyft, P; Wery, M. **Changes in plasma lipid levels as a function of Plasmodium falciparum infection in Sao Tome.** *Parasite (Paris, France)*. 3(4): 335-340, 1996.
- Belkaid, Y. & Tarbell, K. **Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions.** *Annual review of immunology*. 27: 551–589, 2009.
- Beller, TC; Friend, DS; Maekawa, A; Lam, BK; Austen, K. F; Kanaoka, Y. **Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(9): 3047-3052, 2004.
- Berg, A; Patel, S; Gonca, M; David, C; Otterdal, K; Ueland, T; Langeland, N. **Cytokine network in adults with falciparum malaria and HIV-1: increased IL-8 and IP-10 levels are associated with disease severity.** *PloS one*. 9(12): e114480, 2014.
- Bettelli, E; Oukka, M; Kuchroo, VK. **T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity.** *Nat Immunol*. 8: 345-350, 2007.
- Borgeat, P & Samuelsson, B. **Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes Effects of ionophore A23187.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76(5): 2148-2152, 1979.
- Borgeat, P & Samuelsson, B. **Metabolism of arachidonic acid in polymorphonuclear leukocytes. Structural analysis of novel hydroxylated compounds.** *Journal of Biological Chemistry*. 254(16): 7865-7869, 1979.
- Borish, L. **Allergic rhinitis: systemic inflammation and implications for management.** *Journal of allergy and clinical immunology*, 112(6): 1021-1031, 2003.
- Boström, S; Giusti, P; Arama, C; Persson, JO; Dara, V; Traore, B; Troye-Blomberg, M. **Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-**

specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. *Malaria journal*. 11(1): 1, 2012.

- Bothwell, W; Verburg, M; Wynalda, M; Daniels, EG; Fitzpatrick, FA. **A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and E2: an indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 220(2): 229-235, 1982.
- Bou Khalil, M; Hou, W; Zhou, H; Elisma, F; Swayne, LA; Blanchard, AP; Figeys, D. **Lipidomics era: accomplishments and challenges.** *Mass spectrometry reviews*, 29(6), 877-929, 2010.
- Boutlis, CS; Yeo, TW; Anstey, NM. **Malaria tolerance - for whom the cell tolls?** *Trends Parasitol* 22(8): 371-377, 2006.
- Bowers, K. M; Bell, D; Chiodini, PL; Barnwell, J; Incardona, S; Yen, S; Watt, H. **Inter-rater reliability of malaria parasite counts and comparison of methods.** *Malaria journal*. 8(1): 1, 2009.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. **SIVEP-Malária.** Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp>. Acessado em 13 de Julho de 2016, 2016.
- Brasil, Ministério da Saúde, Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Relatório de Situação: Amazonas.** 5^a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Bray, MA; Cunningham, FM; FORD-HUTCHINSON, AW; & Smith, MJH. **Leukotriene B4: a mediator of vascular permeability.** *British journal of pharmacology*. 72(3): 483-486, 1981.
- Buczynski, MW; Dumlao, DS; Dennis, EA. **Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology.** *Journal of lipid research*. 50(6): 1015-1038, 2009.
- Bueno, LL; Morais, CG; Araujo, FF; Gomes, JAS; Corrêa-Oliveira, R; Soares, IS; Braga, ÉM. **Plasmodium vivax: induction of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory**

T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites. *PLoS One*, 5(3): e9623, 2010.

- Bueno, LL; Morais, CG; Lacerda, MV; Fujiwara, RT; Braga, ÉM. **Interleukin-17 producing T helper cells are increased during natural Plasmodium vivax infection.** *Acta tropica*. 123(1): 53-57, 2012.
- Butcher, C. A. **Malaria: a parasitic disease.** *Workplace Health & Safety*. 52(7): 302-310, 2004.
- Carlos, D; Machado, ER; De Paula, L; Sá-Nunes, A; Sorgi, CA; Jamur, MC; Faccioli, LH. **Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following Toxocara canis infection in rats.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 44(4): 319-326, 2011.
- Carter, MD; Harry, SR; Wright, DW. **Identification of hydroxyeicosatetraenoic acid components of schistosomal hemozoin.** *Biochemical and biophysical research communications*. 363(3): 867-872, 2007.
- Chou, WL; Chuang, LM; Chou, CC; Wang, AHJ; Lawson, JA; FitzGerald, GA; Chang, ZF. **Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation.** *Journal of Biological Chemistry*. 282(25): 18162-18172, 2007.
- Chua, CL; Brown, G; Hamilton, JA; Rogerson, S; Boeuf, P. **Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology?** *Trends Parasitol*. 29(1): 26-34, 2013.
- Clark, IA; Budd, AC; Alleva, LM; Cowden, WB. **Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release.** *Malaria Journal*. 5(1): 1, 2006.
- Coelho-Castelo, AAM; Trombone, APF; Rocha, CD; Lorenzi, JCC. **Resposta imune a Doenças Infecciosas.** *Medicina*. 42(2): 127-142, 2009.
- Cogolludo, A; Moreno, L; Bosca, L; Tamargo, J; Perez-Vizcaino, F. **Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and**

pulmonary vasoconstriction role of protein kinase C ζ . *Circulation research*. 93(7): 656-663, 2003.

- Cohen, S; Butcher, GA. **Serum antibody in acquired malarial immunity.** *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 65: 125-135, 1971.
- Coleman, RE; Maneechai, N; Rachaphaew, N; Kumpitak, C; Miller, RS; Soyseng, V; Sattabongkot, J. **Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax in western Thailand.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 67(2): 141-144, 2002.
- Corrigan, C; Mallett, K; Ying, S; Roberts, D; Parikh, A; Scadding, G; Lee, T. **Expression of the cysteinyl leukotriene receptors CysLT 1 and CysLT 2 in aspirin-sensitive and aspirin-tolerant chronic rhinosinusitis.** *Journal of allergy and clinical immunology*. 115(2): 316-322, 2005.
- Costa, ADP; Bressan, CDS; Pedro, RS; Valls-de-Souza, R; Silva, SD; Souza, PRD; Brasil, P. **Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 43(5): 571-574, 2010.
- Couper, KN; Barnes, T; Hafalla, JCR; Combes, V; Ryffel, B; Secher, T; Grau, GE; Riley, EM; Souza, JB. **Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation.** *PLoS Pathog*. 6(1): 1-13, 2011.
- da Silva Santos, S; Clark, TG; Campino, S; Suarez-Mutis, MC; Rockett, KA; Kwiatkowski, DP; Fernandes, O. **Investigation of host candidate malaria-associated risk/protective SNPs in a Brazilian Amazonian population.** *PloS one*. 7(5): 366-373, 2012.
- Dalko, E; Das, B; Herbert, F; Fesel, C; Pathak, S; Tripathy, R; Pied, S. **Multifaceted Role of Heme during Severe Plasmodium falciparum Infections in India.** *Infection and immunity*. 83(10): 3793-3799, 2015.

- Dasari, P; Heber, SD; Beisele, M; Torzewski, M; Reifenberg, K; Orning, C; Fries, A; Zapf, AL; Baumeister, S; Lingelbach, K; Udomsangpetch, R; Bhakdi, SC; Reiss, K; Bhakdi, S. **Digestive vacuole of Plasmodium falciparum released during erythrocyte rupture dually activates complement and coagulation** *Blood*. 119(18): 4301-4310, 2012.
- de Souza Leoratti, FM; Trevelin, SC; Cunha, FQ; Rocha, BC; Costa, PAC; Gravina, HD; Gazzinelli, RT. **Neutrophil paralysis in Plasmodium vivax malaria.** *PLoS Negl Trop Dis*. 6(6): e1710, 2012.
- de Souza-Cruz, S; Victória, MB; Tarragô, AM; da Costa, AG; Pimentel, JPD; Pires, EF; Teixeira-Carvalho, A. **Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10.** *BMC microbiology*. 16(1): 1, 2016.
- Diallo, M; Aldebert, D; Moreau, JC; Ndiaye, M; Jambou R. **Decrease of lymphoid dendritic cells in blood from malaria-infected pregnant women.** *Int J Parasitol*. 38: 1557-1565, 2008.
- Dieye, Y; Mbengue, B; Dagamajalu, S; Fall, MM; Loke, M. F; Nguer, CM; Dieye, A. **Cytokine response during non-cerebral and cerebral malaria: evidence of a failure to control inflammation as a cause of death in African adults.** *PeerJ*. 4: 1965, 2016.
- Dodge, W & Thomas, M. **The effect of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid on the proliferation of granulocyte progenitors and embryonic fibroblasts of the chick.** *Biochemical and biophysical research communications*. 131(2): 731-735, 1985.
- Doolan, DL & Hoffman, SL. **IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8⁺ T cells in the Plasmodium yoelii model** *J Immunol*. 163: 884-892, 1999.
- Drazen, JM; O'BRIEN, JEANNE; Sparrow, D; Weiss, ST; Martins, MA; Israel, E; Fanta, CH. **Recovery of Leukotriene E4 from the Urine of Patients.** *Am Rev Respir Dis*. 148: 104-108, 1992.

- Druilhe, P & Perignon, J. L. **A hypothesis about the chronicity of malaria infection.** *Parasitology Today*. 13(9): 353-357, 1997.
- Druilhe, P & Pérignon, J. L. **The Role of Variant-specific Immunity in Asymptomatic Malaria Infections: Maintaining a Fine Balance-Reply.** *Parasitology Today*. 14(5): 208. 1998.
- Dumlao, DS; Buczynski, MW; Norris, PC; Harkewicz, R; Dennis, EA. **High-throughput lipidomic analysis of fatty acid derived eicosanoids and N-acylethanolamines.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1811(11): 724-736, 2011.
- Elloso, MM; van der Heyde, HC; vande Waa, JA; Manning, DD; Weidanz, WP. **Inhibition of Plasmodium falciparum in vitro by human gamma delta T cells** *J Immunol*. 153: 1187-1194, 1994.
- Engwerda CR & Good MF. **Interactions between malaria parasites and the host immune system.** *Curr Opin Immunol*. 17: 381-387, 2005.
- Faccioli, LH; Nourshargh, S; Moqbel, R; Williams, FM; Sehmi, R; Kay, AB; Williams, TJ. **The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo.** *Immunology*, 73(2): 222, 1991.
- Fernandes, AAM; de Moura Carvalho, LJ; Zanini, GM; da Silva Ventura, AMR; Souza, JM; Cotias, PM; Daniel-Ribeiro, CT. **Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in the Brazilian Amazon region.** *Clinical and Vaccine Immunology*. 15(4): 650-658, 2008.
- Fitzpatrick, FA; Aguirre, R; Pike, JE; Lincoln, FH. **The stability of 13, 14-dihydro-15 keto-PGE 2.** *Prostaglandins*. 19(6): 917-931, 1980.
- Flamand, N; Surette, ME; Picard, S; Bourgoin, S; Borgeat, P. **Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils.** *Molecular Pharmacology*. 62(2): 250-256, 2002.

- Francis, SE; Sullivan DJ, Jr; Goldberg DE. **Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Annu Rev Microbiol.* 51: 97-123, 1997.
- Franklin, BS; Ishizaka, ST; Lamphier, M; Gusovsky, F; Hansen, H; Rose, J; Gazzinelli, RT. **Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 108(9): 3689-3694, 2011.
- Fretland, DJ; Widomski, DL; Anglin, CP; Walsh, RE; Levin, S; Gaginella, TS. **6-trans-leukotriene B4 is a neutrophil chemotaxin in the guinea pig dermis.** *Journal of leukocyte biology.* 49(3): 283-288, 1991.
- Funk, CD. **Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.** *Science.* 294(5548): 1871-1875, 2001.
- Gallego-Delgado, J; Ty, M; Orengo, JM; van de Hoef, D; Rodriguez, A. **A surprising role for uric acid: the inflammatory malaria response.** *Current rheumatology reports.* 16(2): 1-6, 2014.
- Galvão, AF; Petta, T; Flamand, N; Bollela, VR; Silva, CL; Jarduli, LR; Faccioli, LH. **Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment.** *Analytical and bioanalytical chemistry.* 408(13): 3613-3623, 2016.
- Garraud, O; Mahanty, S; Perraut, R. **Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design.** *Trends Immunol.* 24: 30-35, 2003.
- Gauvreau, GM; Boulet, LP; Postma, DS; Kawayama, T; Watson, RM; Duong, M; O'Byrne, PM. **Effect of low-dose ciclesonide on allergen-induced responses in subjects with mild allergic asthma.** *Journal of allergy and clinical immunology.* 116(2): 285-291, 2005.

- Geleta, G & Ketema, T. **Severe malaria associated with Plasmodium falciparum and P. vivax among children in Pawe Hospital, Northwest Ethiopia.** *Malaria research and treatment*, 2016.
- Genton, B; D'Acremont, V; Rare, L; Baea, K; Reeder, JC; Alpers, MP; Müller, I. **Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea.** *PLoS Med.* 5(6): e127, 2008.
- Giribaldi, G; Prato, M; Ulliers, D; Gallo, V; Schwarzer, E; Akide-Ndunge, OB; Valente, E; Saviozzi, S; Calogero, RA; Arese, P. **Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment.** *Infect. Immun.* 78(11): 4912-4921, 2010.
- Goncalves, RM; Scopel, KK; Bastos, MS; Ferreira, MU. **Cytokine balance in human malaria: does Plasmodium vivax elicit more inflammatory responses than Plasmodium falciparum?** *PLoS One.* 7(9): e44394, 2012.
- González, JM; Peter, K; Esposito, F; Nebie, I; Tiercy, JM; Bonelo, A; Arevalo-herrera, M; Valmori, D; Romero, P; Herrera, S; Corradin, G; Lopez, JA. **HLA-A*0201 restricted CD8+ T-lymphocyte responses to malaria: identification of new Plasmodium falciparum epitopes by IFN-gamma ELISPOT.** *Parasite Immunol.* 22: 501-514, 2000.
- Good, MF; Xu, H; Wykes, M; Engwerda, CR. **Development and regulation of cellmediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine.** *Research Annu Rev Immunol.* 23: 69-99, 2005.
- Green, MD; Xiao, L; Lal, AA. **Formation of hydroxyeicosatetraenoic acids from hemozoin-catalyzed oxidation of arachidonic acid.** *Molecular and biochemical parasitology.* 83(2): 183-188, 1996.
- Greenwood, BM; Bojang, K; Whitty, CJ; Targett, GA. **Malaria.** *Lancet.* 365:1487-1498, 2005.
- Guimarães da Costa, A; do Valle Antonelli, LR; Augusto Carvalho Costa, P; Paulo Diniz Pimentel, J; Garcia, NP; Monteiro Tarragô, A; Teixeira-Carvalho, A.

The robust and modulated biomarker network elicited by the Plasmodium vivax infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. *Journal of immunology research*. 2014: p.11, 2014.

- Haeggström, JZ & Funk, CD. **Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease.** *Chemical reviews*. 111(10): 5866-5898, 2011.
- Hagve, TA; Woldseth, B; Brox, J; Narce, M; Poisson, JP. **Membrane fluidity and fatty acid metabolism in kidney cells from rats fed purified eicosapentaenoic acid or purified docosahexaenoic acid.** *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 58(3): 187-194, 1998.
- Harkewicz, R & Dennis, EA. **Applications of mass spectrometry to lipids and membranes.** *Annual review of biochemistry*. 80: 301, 2011.
- Harris, SG; Padilla, J; Koumas, L; Ray, D; Phipps, RP. **Prostaglandins as modulators of immunity.** *Trends in immunology*. 23(3): 144-150, 2002.
- Hartwig, JH; Bokoch, GM; Carpenter, CL; Janmey, PA; Taylor, LA; Toker, A; Stossel, TP. **Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets.** *Cell*. 82(4): 643-653, 1995.
- Hensmann, M & Kwiatkowski, D. **Cellular basis of early cytokine response to Plasmodium falciparum** *Infect Immun*. 69: 2364-2371, 2001.
- Herbert, F; Tchitchek, N; Bansal, D; Jacques, J; Pathak, S., Bécavin, C; Ravindran, B. **Evidence of IL-17, IP-10, and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to Plasmodium falciparum malaria.** *Journal of translational medicine*. 13(1): 1, 2015.
- Hisaeda, H; Maekawa, Y; Iwakawa, D; Okada, H; Himeno, K; Kishihara, K; Yasutomo, K. **Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells.** *Nature medicine*. 10(1): 29-30, 2004.

- Hisaeda, H; Yasutomo, K; Himeno, K. **Malaria: immune evasion by parasites.** *The international journal of biochemistry & cell biology.* 37(4): 700-706, 2005.
- Humeida, H; Pradel, G; Stich, A; Krawinkel, MB. **The effect of glucose and insulin on in vitro proliferation of Plasmodium falciparum.** *Journal of Diabetology.* 3: 6, 2011.
- Ishida, H; Matsuzaki-Moriya, C; Imai, T; Yanagisawa, K; Nojima, Y; Suzue, K; Hirai, M; Iwakura, Y; Yoshimura, A; Hamano, S; Shimokawa, C; Hisaeda, H. **Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17.** *Biochem Biophys Res Commun.* 402: 790-795, 2010.
- Issan, Y; Hochhauser, E; Guo, A; Gotlinger, KH; Kornowski, R; Leshem-Lev, D; Abraham, NG. **Elevated level of pro-inflammatory eicosanoids and EPC dysfunction in diabetic patients with cardiac ischemia.** *Prostaglandins & other lipid mediators.* 100: 15-21, 2013.
- Iwakura, Y; Nakae, S; Saijo, S; Ishigame, H. **The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens.** *Immunol Rev.* 226: 57-79, 2008.
- Jacobs, P; Radzioch, D; Stevenson, MM. **In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice.** *Infect Immun.* 64(1): 44-49, 1996.
- Janssens, W; Carlier, V; Wu, B.; VanderElst, L; Jacquemin, MG; Saint-Remy, JMR. **CD4⁺ CD25⁺ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner.** *The Journal of Immunology.* 171(9): 4604-4612, 2003.
- Jobe, O; Donofrio, G; Sun, G; Liepinsh, D; Schwenk, R; Krzych, U. **Immunization with radiation-attenuated Plasmodium berghei sporozoites induces liver cCD8 α +DC that activate CD8⁺T cells against liver-stage malaria.** *PLoS One.* 4: e5075, 2009.

- John, CC; Opika-Opoka, R; Byarugaba, J; Idro, R; Boivin, MJ. **Low levels of RANTES are associated with mortality in children with cerebral malaria.** *Journal of Infectious Diseases.* 194(6): 837-845, 2006.
- Kabashima, K; Murata, T; Tanaka, H; Matsuoka, T; Sakata, D; Yoshida, N; Nagai, H. **Thromboxane A2 modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity.** *Nature immunology.* 4(7): 694-701, 2003.
- Kanaoka, Y & Boyce, J. A. **Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses.** *The Journal of Immunology.* 173(3): 1503-1510, 2004.
- Keating, SM; Bejon, P; Berthoud, T; Vuola, JM; Todryk, S; Webster, DP; Dunachie, SJ; Moorthy, VS; Mcconkey, SJ; Gilbert, SC; Hill, AV. **Durable human memory T cells quantifiable by cultured enzyme-linked immunospot assays are induced by heterologous prime boost immunization and correlate with protection against malaria.** *J Immunol.* 175(9): 5675-5680, 2005.
- Keller, CC; Davenport, GC; Dickman, KR; Hittner, JB; Kaplan, SS; Weinberg, J. B; Perkins, DJ. **Suppression of Prostaglandin E2 by Malaria Parasite Products and Antipyretics Promotes Overproduction of Tumor Necrosis Factor- α : Association with the Pathogenesis of Childhood Malarial Anemia.** *Journal of Infectious Diseases.* 193(10): 1384-1393, 2006.
- Keller, CC; Hittner, JB; NTI, BK; Weinberg, JB; Kremsner, PG; Perkins, DJ. **Reduced peripheral PGE2 biosynthesis in plasmodium falciparum malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via an interleukin-10-independent mechanism.** *Molecular medicine.* 10(1-6): 45-54, 2004.
- König, D; Berg, A; Weinstock, C; Keul, J; Northoff, H. **Essential fatty acids, immune function, and exercise.** *Exercise immunology review.* 3: 1-31, 1996.
- Krishna, AP; Kumar, S; Acharya, M; Patil, SL. **Variation in common lipid parameters in malaria infected patients,** 2009.

- Krishnegowda, G; Hajjar, AM; Zhu, J; Douglass, EJ; Uematsu, S; Akira, S; Gowda, DC. **Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity.** *J Biol Chem.* 280(9): 8606-8616, 2005.
- Lacerda, MV; Mourão, MP; Alexandre, MA; Siqueira, AM; Magalhães, BM; Martinez-Espinosa, FE; Couto, VS. **Understanding the clinical spectrum of complicated Plasmodium vivax malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature.** *Malaria journal.* 11(1): 1, 2012.
- Lacerda, MVG; Mourão, MPG; Coelho, HCC; Santos, JB. **Thrombocytopenia in malaria: who cares?** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 106: 52-63, 2011.
- Lacerda-Queiroz, N; Lima, OCO; Carneiro, CM; Vilela, MC; Teixeira, AL; Teixeira-Carvalho, A; Carvalho-Tavares, J. **Plasmodium berghei NK65 induces cerebral leukocyte recruitment in vivo: an intravital microscopic study.** *Acta tropica.* 120(1): 31-39, 2011.
- Langhorne, J; Morris-Jones, S; Casabo, LG; Goodier, M. **The response of gamma delta T cells in malaria infections: a hypothesis** *Res Immunol.* 145: 429-436, 1994.
- Langhorne, J; Ndungu, FM; Sponaas, AM; Marsh, K. **Immunity to malaria: more questions than answers.** *Nature immunology.* 9(7): 725-732, 2008.
- Larsson, SC; Kumlin, M; Ingelman-Sundberg, M; Wolk, A. **Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms.** *The American journal of clinical nutrition,* 79(6): 935-945, 2004.
- Lawrence, T; Willoughby, DA; Gilroy, DW. **Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation.** *Nature Reviews Immunology.* 2(10): 787-795, 2002.
- Lawson, JA; Patrono, C; Ciabattini, G; FitzGerald, GA. **Long-lived enzymatic metabolites of thromboxane B₂ in the human circulation.** *Analytical biochemistry.* 155(1): 198-205, 1986.

- Lee, CW; Lewis, RA; Tauber, AI; Mehrotra, M; Corey, EJ; Austen, KF. **The myeloperoxidase-dependent metabolism of leukotrienes C4, D4, and E4 to 6-trans-leukotriene B4 diastereoisomers and the subclass-specific S-diastereoisomeric sulfoxides.** *Journal of Biological Chemistry.* 258(24): 15004-15010, 1983.
- Lewis, RA; & Austen, KF. (1984). **The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology.** *Journal of Clinical Investigation.* 73(4): 889, 1984.
- Lewkowicz, P; Lewkowicz, N; Sasiak, A; Tchórzewski, H. **Lipopolysaccharide-activated CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death.** *The Journal of Immunology.* 177(10): 7155-7163, 2006.
- Lopera-Mesa, TM; Mita-Mendoza, NK; van de Hoef, DL; Doumbia, S; Konaté, D; Doumbouya, M; Anderson, JM. **Plasma uric acid levels correlate with inflammation and disease severity in Malian children with Plasmodium falciparum malaria.** *PLoS One.* 7(10): e46424, 2012.
- Machado, ER; Carlos, D; Lourenço, EV; Souza, GE; Sorgi, CA; Silva, ÉV; Faccioli, LH. **Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of Strongyloides venezuelensis infection.** *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 59(1): 18-32, 2010.
- Machado, ER; Carlos, D; Sorgi, CA; Ramos, SG; Souza, DI; Soares, EG; Faccioli, LH. **Dexamethasone effects in the Strongyloides venezuelensis infection in a murine model.** *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 84(6): 957-966, 2011.
- Machado, ER; Ueta, MT; Lourenço, EV; Anibal, FF; Sorgi, CA; Soares, EG; Faccioli, LH. **Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis.** *The Journal of Immunology.* 175(6): 3892-3899, 2005.
- Mackintosh, CL; Beeson, JG; Marsh, K. **Clinical features and pathogenesis of severe malaria.** *Trends Parasitol.* 20(12): 597-603, 2004.

- MacMullin, G; Mackenzie, R; Lau, R; Khang, J; Zhang, H; Rajwans, N; Pillai, DR. **Host immune response in returning travellers infected with malaria.** *Malaria journal*, 11(1): 1, 2012.
- Magnusson, C; Mezhybovska, M; Lörlinc, E; Fernebro, E; Nilbert, M; Sjölander, A. **Low expression of CysLT 1 R and high expression of CysLT 2 R mediate good prognosis in colorectal cancer.** *European journal of cancer*. 46(4): 826-835, 2010.
- Maier, KG; & Roman, RJ. **Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the control of renal function.** *Current opinion in nephrology and hypertension*. 10(1): 81-87, 2001.
- Matuschewski, K. **Getting infectious: formation and maturation of Plasmodium sporozoites in the Anopheles vector.** *Cellular Microbiology*. 8(10): 1547–1556, 2006.
- McGregor, IA. **Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man.** *Bull World Health Organ*. 50: 259-266, 1974.
- Medeiros, AI; Malheiro, A; Jose, PJ; Conroy, DM; Williams, TJ; Faccioli, LH. **Differential release of MIP-1 α and eotaxin during infection of mice by Histoplasma capsulatum or inoculation of β -glucan.** *Inflammation Research*. 53(8): 351-354, 2004.
- Medeiros, AI; Sá-Nunes, A; Soares, EG; Peres, CM; Silva, CL; Faccioli, LH. **Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis.** *Infection and immunity*. 72(3): 1637-1644, 2004.
- Medeiros, AI; Sá-Nunes, A; Turato, WM; Secatto, A; Frantz, FG; Sorgi, CA; Faccioli, LH. **Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells.** *The Journal of Immunology*. 181(12): 8544-8551, 2008.
- Medina, TS; Costa, SP; Oliveira, MD; Ventura, AM; Souza, JM; Gomes, TF; Cunha, MG. **Increased interleukin-10 and interferon- γ levels in Plasmodium**

vivax malaria suggest a reciprocal regulation which is not altered by IL-10 gene promoter polymorphism. *Malaria journal*. 10(1): 1, 2011.

- Medzhitov, R & Janeway, CJr . **Innate immunity.** *N Engl J Med*. 343(5): 338-344, 2000.
- Mellor, EA; Frank, N; Soler, D; Hodge, MR; Lora, JM; Austen, KF; Boyce, JA. **Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: functional distinction from CysLT1R.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(20): 11589-11593, 2003.
- Mendonça, VR; Queiroz, AT; Lopes, FM; Andrade, BB; Barral-Netto, M. **Networking the host immune response in Plasmodium vivax malaria.** *Malaria journal*. 12(1): 1, 2013.
- Mendonça, VR; Souza, LC; Garcia, GC; Magalhães, BM; Gonçalves, MS; Lacerda, MV; Barral-Netto, M. **Associations between hepcidin and immune response in individuals with hyperbilirubinaemia and severe malaria due to Plasmodium vivax infection.** *Malaria journal*. 14(1): 1, 2015.
- Mesaros, C; Lee, SH; Blair, IA. **Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 877(26): 2736-2745, 2009.
- Meslier, N; Aldrich, AJ; Bigby, TD. **Effect of interferon-on the 5-lipoxygenase pathway of rat lung macrophages.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*; 6: 93-99, 1992.
- Mesquita, TC; Martin, TG; Alves, ER; Mello, MB; Nery, AF; Gomes, LT; Fontes, CJF. **Changes in serum lipid profile in the acute and convalescent Plasmodium vivax malaria: A cohort study.** *Acta Tropica*. 163: 1-6, 2016.
- Miller, LH; Baruch, DI; Marsh, K; Doumbo, OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature*. 415(6872): 673-679, 2002.
- Minigo, G; Woodberry, T; Piera, KA; Salwati, E; Tjitra, E; Kenangalem, E; Plebanski, M. **Parasite-dependent expansion of TNF receptor II-positive**

regulatory T cells with enhanced suppressive activity in adults with severe malaria. *PLoS Pathog.* 5(4): e1000402, 2009.

- Misra, N; Bayry, J; Lacroix-Desmazes, S; Kazatchkine, MD; Kaveri, SV. **Cutting edge: human CD4⁺ CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells.** *The Journal of Immunology.* 172(8): 4676-4680, 2004.
- Mita, H; Hasegawa, M; Saito, H; Akiyama, K. **Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils.** *Clinical & Experimental Allergy.* 31(11): 1714-1723, 2001.
- Mitchell, RA; Liao, H; Chesney, J; Fingerle-Rowson, G; Baugh, J; David, J; Bucala, R. **Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99(1): 345-350, 2002.
- Moorthy VS; Good MF; Hill AV. **Malaria vaccine developments.** *Lancet.* 363: 150-156, 2004.
- Murphy, RC; Fiedler, J; Hevko, J. **Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry.** *Chemical Reviews.* 101(2): 479-526, 2001.
- Ndungu FM; Urban BC; Marsh K; Langhorne J. **Regulation of immune response by Plasmodium-infected red blood cells.** *Parasite Immunol.* 27: 373-384, 2005.
- Needleman, P; Moncada, S; Bunting, S; Vane, JR; Hamberg, M; Samuelsson, B. **Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides.** *Nature.* 261(5561): 558, 1976.
- Obata, T; Nakano, Y; Looareesuwan, S; Ohtomo, H; Aikawa, M. **Prostaglandin spectrum in falciparum malaria patients.** In *International Congress Series.* 1233: 475-478 2002.

- O'Flaherty, JT; Rogers, LC; Paumi, CM; Hantgan, RR; Thomas, LR; Clay, CE; Kute, TE. **5-Oxo-ETE analogs and the proliferation of cancer cells.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1736(3): 228-236, 2005.
- Ojo-Amaize, EA; Vilcek, J; Cochrane, AH; Nussenzweig, RS. **Plasmodium berghei sporozoites are mitogenic for murine T cells, induce interferon, and activate natural killer cells.** *J Immunol*. 133: 1005-1009, 1984.
- Oliveira-Filho, A. B & Martinelli, J. M. **Casos notificados de malária no Estado do Pará , Amazônia Brasileira, de 1998 a 2006.** *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 18(3): 277-284, 2008.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2013.** Library Cataloguing in Publication Data, 2013. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/. Acessado em 29 de Novembro de 2013.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2015.** Library Cataloguing in Publication Data, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. Acessado em 30 de Julho de 2016.
- Palomino, DCT & Marti, LC. **Chemokines and immunity.** *Einstein (São Paulo)*. 13(3): 469-473, 2015.
- Panigrahy, D; Greene, ER; Pozzi, A; Wang, DW; Zeldin, DC. **EET signaling in cancer.** *Cancer and Metastasis Reviews*. 30(3-4): 525-540, 2011.
- Panigrahy, D; Kaipainen, A; Greene, ER; Huang, S. **Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer.** *Cancer and Metastasis Reviews*. 29(4): 723-735, 2010.
- Parroche, P; Lauw, FN; Goutagny, N; Latz, E; Monks, BG; Visintin, A; Gazzinelli, RT. **Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(6): 1919-1924, 2007.

- Patrono, C; Ciabattini, G; Pugliese, F; Pierucci, A; Blair, IA; FitzGerald, GA. **Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans.** *Journal of Clinical Investigation.* 77(2): 590, 1986.
- Peres, CM; de Paula, L; Medeiros, AI; Sorgi, CA; Soares, EG; Carlos, D; Faccioli, LH. **Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Microbes and Infection.* 9(4): 483-489, 2007.
- Peres-Buzalaf, C; De Paula, L; Frantz, FG; Soares, EM; Medeiros, AI; Peters-Golden, M; Faccioli, LH. **Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 85(2): 75-81, 2011.
- Perkins, DJ; Hittner, JB; Mwaikambo, ED; Granger, DL; Weinberg, JB; Anstey, NM. **Impaired systemic production of prostaglandin E2 in children with cerebral malaria.** *Journal of Infectious Diseases.* 191(9): 1548-1557, 2005.
- Perkins, DJ; Kremsner, PG; Weinberg, JB. **Inverse Relationship of Plasma Prostaglandin E2 and Blood Mononuclear Cell Cyclooxygenase-2 with Disease Severity in Children with *Plasmodium falciparum* Malaria.** *Journal of Infectious Diseases.* 183(1): 113-118, 2001.
- Perry JA; Rush A; Wilson RJ; Olver CS; Avery AC. **Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC.** *J Immunol.* 172: 475-482, 2004.
- Peters-Golden, M & Henderson Jr, WR. **Leukotrienes.** *New England Journal of Medicine.* 357(18): 1841-1854, 2007.
- Peters-Golden, M; Canetti, C; Mancuso, P; Coffey, MJ. **Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses.** *The Journal of Immunology.* 174(2): 589-594, 2005.
- Peters-Golden, M; Canetti, C; Mancuso, P; Coffey, MJ. **Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses.** *The Journal of Immunology.* 174(2): 589-594, 2005.

- Plebanski M & Hill AV. **The immunology of malaria infection.** *Curr Opin Immunol.* 12: 437-441, 2000.
- Powell, WS; Gravelle, F; Gravel, S. **Metabolism of 5 (S)-hydroxy-6, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid and other 5 (S)-hydroxyeicosanoids by a specific dehydrogenase in human polymorphonuclear leukocytes.** *Journal of Biological Chemistry.* 267(27): 19233-19241, 1992.
- Price, RN; Simpson, JA; Nosten, FRANÇOIS; Luxemburger, CHRISTINE; Hkirjaroen, LILI; ter Kuile, FEIKO; White, NJ. **Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 65(5): 614-622 2001.
- Price, RN; Tjitra, E; Guerra, CA; Yeung, S; White, NJ; Anstey, NM. **Vivax malaria: neglected and not benign.** *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 77(6): 79-87, 2007.
- Riccioni, G; Back, M; Capra, V. **Leukotrienes and atherosclerosis.** *Current drug targets.* 11(7): 882-887, 2010.
- Rockett, KA; Awburn, MM; Cowden, WB; Clark, IA. **Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives.** *Infect Immun.* 59 (9): 3280-3283, 1991.
- Rodrigues-da-Silva, RN; Lima-Junior, JDC; Antas, PRZ; Baldez, A; Storer, FL; Santos, F; Oliveira-Ferreira, JD. **Alterations in cytokines and haematological parameters during the acute and convalescent phases of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 109(2): 154-162, 2014.
- Rogerio, AP & Anibal, FF. **Role of leukotrienes on protozoan and helminth infections.** *Mediators of inflammation* 2012.
- Roland, J; Soulard, V; Sellier, C; Drapier, AM; Di Santo, JP; Cazenave, PA; Pied, S. **NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development.** *J Immunol.* 177(2): 1229-1239, 2006.

- Rouzer, CA; Scott, WA; Hamill, AL; Liu, FT; Katz, DH; Cohn, ZA. **Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes.** *The Journal of experimental medicine*. 156(4): 1077-1086, 1982.
- Rovira-Vallbona, E; Moncunill, G; Bassat, Q; Aguilar, R; Machevo, S; Puyol, L; Dobaño, C. **Low antibodies against Plasmodium falciparum and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case–control study.** *Malaria jornal*. 11(1): 1, 2012.
- Sacerdoti, D; Gatta, A; & McGiff, JC. **Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology.** *Prostaglandins & other lipid mediators*. 72(1): 51-71, 2003.
- Sakaguchi, S. **Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance.** *Cell*. 101(5): 455–458, 2000.
- Samuelsson, B. **The leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation.** In *Leukotrienes and Prostacyclin*. 15-41, 1983.
- Saúde, MD & Saúde, SV. **Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil**, 2010.
- Schmieg, J; Gonzalez-Aseguinolaza, G; Tsuji, M. **The role of natural killer T cells and other T cell subsets against infection by the pre-erythrocytic stages of malaria parasites.** *Microbes Infect*. 5: 499-506, 2003.
- Schwenk, U & Schröder, JM. **5-Oxo-eicosanoids are potent eosinophil chemotactic factors. Functional characterization and structural requirements.** *Journal of Biological Chemistry*. 270(25): 15029-15036, 1995.
- Secatto, A; Rodrigues, LC; Serezani, CH; Ramos, SG; Dias-Baruffi, M; Faccioli, LH; Medeiros, Al. **5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection.** *PLoS One*. 7(3): e31701, 2012.
- Sehrawat, S & Rouse, BT. **Tregs and infections: on the potential value of modifying their function.** *Journal of Leukocyte Biology*. 90(6): 1079–1087, 2011.

- Serezani, CH; Perrela, JH; Russo, M; Peters-Golden, M; Jancar, S. **Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility.** *The Journal of Immunology*. 177(5): 3201-3208, 2006.
- Serghides, L; Smith, TG; Patel, SN; Kain, KC. **CD36 and malaria: friends or foes?** *Trends Parasitol*. 19: 461-469, 2003.
- Serhan, CN; Lundberg, U; Weissman, G; Samuelsson, B. **Formation of leukotrienes and hydroxy acids by human neutrophils and platelets exposed to monosodium urate.** *Prostaglandins*. 27(4): 563-581, 1984.
- Shah, S; Ali, L; Sattar, RA; Aziz, T; Ansari, T; Ara, J. **Malarial hepatopathy in falciparum malaria.** *J Coll Physicians Surg Pak*. 19(6): 367-70, 2009.
- Shen, T; Shi, J; Wang, N; Yu, X; Zhang, C; Li, J; Jiang, C. **15-Lipoxygenase and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid regulate intravascular thrombosis in pulmonary hypertension.** *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 309(5): L449-L462, 2015.
- Shinde, DD; Kim, KB; Oh, KS; Abdalla, N; Liu, KH; Bae, SK; Shin, JG. **LC-MS/MS for the simultaneous analysis of arachidonic acid and 32 related metabolites in human plasma: basal plasma concentrations and aspirin-induced changes of eicosanoids.** *Journal of Chromatography B*. 911: 113-121, 2012.
- Shinomiya, S; Naraba, H; Ueno, A; Utsunomiya, I; Maruyama, T; Ohuchida, S; Ichikawa, A. **Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I₂ and E₂: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists.** *Biochemical pharmacology*. 61(9): 1153-1160, 2001.
- Silva, AR; De Assis, EF; Caiado, LF; Marathe, GK; Bozza, MT; McIntyre, TM; Castro-Faria-Neto, HC. **Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein.** *The Journal of Immunology*. 168(8): 4112-4120, 2002.

- Silveira, AC & de Rezende, DF. **Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil.** *Brasília: Opas.* 1-119, 2001.
- Silver, KL; Higgins, SJ; McDonald, CR; Kain, KC. **Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases.** *Cell. Microbiol.* 12(8): 1036-1045, 2010.
- Smith, WL; DeWitt, DL; Garavito, RM. **Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.** *Annual review of biochemistry.* 69(1): 145-182, 2000.
- Snow, RW; Trape, JF; Marsh, K. **The past, present and future of childhood malaria mortality in Africa.** *Trends Parasitol.* 17(12): 593-597, 2001.
- Soares, EM; Mason, KL; Rogers, LM; Serezani, CH; Faccioli, LH; Aronoff, DM. **Leukotriene B4 enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent Streptococcus pyogenes.** *The Journal of Immunology.* 190(4): 1614-1622, 2013.
- Song, J; Liu, X; Wu, J; Meehan, MJ; Blevitt, JM; Dorrestein, PC; Milla, ME. **A highly efficient, high-throughput lipidomics platform for the quantitative detection of eicosanoids in human whole blood.** *Analytical biochemistry.* 433(2): 181-188, 2013.
- Sorgi, CA; Secatto, A; Fontanari, C; Turato, WM; Belangér, C; de Medeiros, AI; Faccioli, LH. **Histoplasma capsulatum cell wall β -glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection.** *The Journal of Immunology.* 182(7): 4025-4035, 2009.
- Spector, AA & Norris, AW. **Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 292(3): C996-C1012, 2007.
- Steinke, JW & Borish, L. **Leukotriene receptors in rhinitis and sinusitis.** *Current allergy and asthma reports.* 4(3): 217-223, 2004.
- Steinke, JW. **The relationship between rhinosinusitis and asthma sinusitis.** *Current allergy and asthma reports.* 6(6): 495-501, 2006.

- Stevenson, MM & Riley, EM. **Innate immunity to malaria.** *Nat Rev Immunol.* 4: 169-180, 2004.
- Sturm, A; Amino, R; Van de Sand, C; Regen, T; Retzlaff, S; Rennenberg, A; Heussler, VT. **Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids.** *Science.* 313(5791): 1287-1290, 2006.
- Suárez-Mutis, MC; Cuervo, P; Leoratti, F; Moraes-Avila, SL; Ferreira, AW; Fernandes, O; Coura, JR. **Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic Plasmodium vivax infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 49(3): 159-164, 2007
- Sugimoto, Y; & Narumiya, S. **Prostaglandin E receptors.** *Journal of Biological Chemistry.* 282(16): 11613-11617, 2007.
- Suttorp, N; Seeger, W; Uhl, J; Lutz, F; & Roka, L. **Pseudomonas aeruginosacytotoxin stimulates prostacyclin production in cultured pulmonary artery endothelial cells: membrane attack and calcium influx.** *Journal of cellular physiology.* 123(1): 64-72, 1985.
- Taams, LS; van Amelsfort, JM; Tiemessen, MM; Jacobs, KM; de Jong, EC; Akbar, AN; Lafeber, FP. **Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells.** *Human immunology.* 66(3): 222-230, 2005.
- Talvani, A; Machado, FS; Santana, GC; Klein, A; Barcelos, L; Silva, J S; Teixeira, MM. **Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in Trypanosomacruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection.** *Infection and immunity.* 70(8): 4247-4253, 2002.
- Tam, VC. **Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections.** In *Seminars in immunology.* 25(3): 240-248, 2013.
- Tanaka, N; Yamaguchi, H; Furugen, A; Ogura, J; Kobayashi, M; Yamada, T; Iseki, K. **Quantification of intracellular and extracellular eicosapentaenoic acid-derived 3-series prostanoids by liquid chromatography/electrospray**

ionization tandem mass spectrometry. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 91(3): 61-71, 2014.

- Tangpukdee, N; Thanachartwet, V; Krudsood, S; Luplertlop, N; Pornpininworakij, K; Chalermrut, K; Wilairatana, P. **Minor liver profile dysfunctions in Plasmodium vivax, P. malariae and P. ovale patients and normalization after treatment.** *The Korean journal of parasitology*. 44(4): 295-302, 2006.
- Tauil. PL. **Perspectives of vector borne diseases control in Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39(3): 275-277, 2006.
- Todryk, SM; Bejon, P; Mwangi, T; Plebanski, M; Urban, B; Marsh, K; Flanagan, KL. **Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4+ CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans.** *PLoS One*. 3(4): e 2027, 2008.
- Torre, D; Speranza, F; Giola, M; Matteelli, A; Tambini, R; Biondi, G. **Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria.** *Am Society for Microbiol*. 9: 348-351, 2002.
- Treffkorn, L; Scheibe, R; Maruyama, T; & Dieter, P. **PGE 2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- α , ET-1, IL-1 α , IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages.** *Prostaglandins & other lipid mediators*. 74(1): 113-123, 2004.
- Trindade, BC; Sorgi, CA; de Figueiredo Nicolete, LD; Malta, TM; Pinto, MT; Takayanagui, OM; Faccioli, LH. **Leukotrienes are upregulated and associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated neuroinflammatory disease.** *PloS one*. 7(12): e51873, 2012.
- Trindade, BC; Theriot, CM; Leslie, JL; Carlson, PE; Bergin, IL; Peters-Golden, M; Aronoff, DM. **Clostridium difficile-induced colitis in mice is independent of leukotrienes.** *Anaerobe*. 30: 90-98, 2014.
- Trzonkowski, P; Szmit, E; Myśliwska, J; Dobyszek, A; Myśliwski, A. **CD4+ CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction.** *Clinical Immunology*. 112(3): 258-267, 2004.

- Urban BC; Ferguson DJ; Pain A; Willcox N; Plebanski M; Austyn JM; Roberts DJ. **Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells.** *Nature*. 400: 73-77, 1999.
- Vane, JR; Bakhle, YS; Botting, RM. **Cyclooxygenases 1 and 2.** *Annual review of pharmacology and toxicology*. 38(1): 97-120, 1998.
- Venet, F; Pachot, A; Debard, AL; Bohe, J; Bienvenu, J; Lepape, A; Monneret, G. **Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism.** *The Journal of Immunology*. 177(9): 6540-6547, 2006.
- Wallace, FA; Miles, EA; Calder, PC. **Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects.** *British Journal of Nutrition*. 89(5): 679-689, 2003.
- Walther, M; Tongren, JE; Andrews, L; Korbel, D; King, E; Fletcher, H; Edele, F. **Upregulation of TGF- β , FOXP3, and CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection.** *Immunity*. 23(3): 287-296, 2005.
- Wangala, B; Vovor, A; Gantin, R; Agbeko, Y; Lechner, C; Huang, X; Köhler, C. **Chemokine levels and parasite-and allergen-specific antibody responses in children and adults with severe or uncomplicated Plasmodium falciparum malaria.** *European Journal of Microbiology and Immunology*. 5(1): 131-141, 2015.
- Webster, D & Hill, AV. **Progress with new malaria vaccines.** *Bull World Health Orga*. 81: 902-909, 2003.
- Wen, Y; Gu, J; Chakrabarti, SK; Aylor, K; Marshall, J; Takahashi, Y; Nadler, JL. **The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in macrophages.** *Endocrinology*. 148(3): 1313-1322, 2007.
- Wilson, N. O; Jain, V; Roberts, CE; Lucchi, N; Joel, PK; Singh, MP; Stiles, JK. **CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria.** *Disease markers*. 30(1): 39-49, 2011.

- Wu, Y; Wang, QH; Zheng, L; Feng, H; Liu, J; Ma, SH; Cao, YM. **Plasmodium yoelii: distinct CD4+ CD25+ regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice.** *Experimental parasitology*. 115(3): 301-304, 2007.
- Xiao, L; Patterson, PS; Yang, C; Lal, AA. **Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria.** *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 60(4): 668-673, 1999.
- Yang, XO; Panopoulos, AD; Nurieva, R; Chang, SH; Wang, D; Watowich, SS; Dong, C. **STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells.** *J Biol Chem*. 282: 9358-9363, 2007.
- Yildiz Zeyrek, F; Kurcer, MA; Zeyrek, D; Simsek, Z. **Parasite density and serum cytokine levels in Plasmodium vivax malaria in Turkey.** *Parasite immunology*. 28(5): 201-207, 2006.
- Zarini, S; Gijón, MA; Folco, G; Murphy, RC. **Effect of arachidonic acid reacylation on leukotriene biosynthesis in human neutrophils stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.** *Journal of Biological Chemistry*. 281(15): 10134-10142, 2006.
- Zhu, J; Krishnegowda, G; Gowda DC. **Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide.** *J Biol Chem*. 280(9): 8617-27, 2005.

Apêndice

APÊNDICES

Apêndice 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-FMT-HVD

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO ((FMT-HVD))	
---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EICOSANÓIDES E CITOCINAS EM PACIENTES INFECTADOS COM MALARIA VIVAX

Pesquisador: Pericles Gama Abreu Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49472515.5.0000.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.358.078

Apresentação do Projeto:

2A versão, com carta resposta ao CEP FMT HVD, para cada item identificado como pendência em parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Os eicosanóides podem estar participando no controle da resposta imunológica de pacientes com malária?

Objetivo Primário:

Caracterizar a produção de eicosanóides e citocinas no sangue total periférico, de pacientes infectados com Plasmodium vivax na cidade de

Manaus, Amazonas.

Objetivo Secundário:

1. Descrever o perfil de eicosanóides (lipidoma) em sangue total de pacientes com malária vivax, estimulado ou não com Tapsigargina ou Ionóforo de Cálcio; 2. Avaliar o perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 (TGF-, IL-6, IL-23 e IL-17A) e quimiocinas (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 e IP-10) em sangue periférico de pacientes com malária vivax; 3. Relacionar o perfil de citocinas e quimiocinas

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.358.078

com a produção de eicosanoides em pacientes com malária de acordo com o índice parasitário, anemia, número de infecções e plaquetas; 4. Avaliar a agregação plaquetária, os eicosanoides e citocinas e formados a partir de plaquetas ativadas de pacientes infectados com malária vivax.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos referentes a este estudo são considerados mínimos uma vez que as amostras serão coletadas por profissionais capacitados. Podendo ou não causar um desconforto pela picada da agulha ou formar manchas roxas (hematomas) no local onde ocorreu a coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Acréscimos da anuência da instituição co participante FHEMOAM

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE reformulado, mantém alguns termos técnicos, porém, considerados de menor possibilidade de troca para apresentação coloquial.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIAS:

Estudo com justificativa técnica. No entanto, pesquisadores não esclarecem se e como será transportado material para FHEMOAM, da demanda de pac. com malária da FMT HVD:

-Informam coletas a serem realizadas no lab. de malária, uma parte enviada, após preparo e armazenamento à -80, para a FHEMOAM, em carro próprio; e outra parte para Lab. de Imunologia da Faculdade de Ribeirão Preto/SP, em caixas térmicas próprias.

Informar em qual das instituições ocorrerá a etapa de dosagem e identificação de citocinas e mediadores.

-Instituição acima mencionada em SP.

Informações divergentes na PB quanto à uso de dados e prontuários, informaram "não".-Informar esclarecimentos acima;-Adequar item "RISCOS": excluir da frase condição de adversidade, risco de hematoma, "mas" a coleta será no braço... (...);-Adequar TCLE: itens CNS 466, substituir linguagem

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.358.078

técnica, o item riscos conforme mencionado acima; esclarecendo qtde total de material a ser coletado.
-Esclarecem em TCLE 2 amostras, em D0 e ao final do tratamento, de 24 ml,cada. Adequada frase sobre coleta e riscos de hematomas em Membro superior; no entanto na versão do projeto na PB os autores mantêm "risco mínimo".

- Apresentar anuência assinada (diretoria) da instituição co-participante (FHEMOAM).
- aNUÊNCIA ASSINADA anexada

Dentro da relevância técnica, e por considerar pendências atendidas, com cuidado à segurança na participação voluntária, adequações em TCLE, considera-se para apreciação deste CEP FMT HVD, com aprovado. Cabem observações seguintes: ratificar aos autores quanto à classificação de risco que os mesmos impõe ("mínimos"), para que compreendam a existência, e a aceitem, de riscos em todo e qualquer estudo envolvendo seres humanos. Ainda, sobre a aplicação em dois momentos diferentes (D0 e ao final do tratamento), do TCLE, já que no mesmo consta para coleta de 24 ml apenas, para assinatura do participante.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_583673.pdf	28/10/2015 13:31:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoVersaoCEP.pdf	28/10/2015 13:29:23	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Outros	CartaemRespostaaosQuestionamentosdoCEP.pdf	28/10/2015 13:27:47	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/10/2015 13:26:04	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

UF: AM

Telefone: (92)2127-3572

Município: MANAUS

Fax: (92)2127-3572

CEP: 69.040-000

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



Continuação do Parecer: 1.358.078

Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuenciahemoam.pdf	21/10/2015 19:23:55	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_pesquisador7.pdf	22/09/2015 16:56:32	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_pesquisador6.pdf	22/09/2015 16:55:53	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_pesquisador5.pdf	22/09/2015 16:53:14	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_pesquisador4.pdf	22/09/2015 16:50:30	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_pesquisador3.pdf	22/09/2015 16:48:57	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_pesquisador2.pdf	22/09/2015 16:47:29	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_do_Pesquisador.pdf	22/09/2015 16:45:13	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaFMTHVD.pdf	22/09/2015 15:55:29	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Assinada.pdf	22/09/2015 15:49:50	Pericles Gama Abreu Filho	Aceito

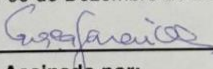
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 09 de Dezembro de 2015


Assinado por:
P/ Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

Apêndice 02: TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO (FMT-HVD)

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS (FHEMOAM)
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: **“CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EICOSANOIDES E CITOCINAS EM PACIENTES INFECTADOS COM MALARIA VIVAX”**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Péricles Gama Abreu Filho, Adriana Malheiro Alle Marie e Carlos Arterio Sorgi.

Gostaríamos de convidá-lo a participar desta pesquisa que será desenvolvida pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em parceria com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM), com o objetivo de caracterizar a produção de componentes envolvidos na inflamação (eicosanoides e citocinas) no sangue de pacientes infectados com *Plasmodium vivax* na cidade de Manaus, Amazonas e associar sua produção com a parasitemia, anemia, número de infecções e plaquetas.

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas você poderá questionar os pesquisadores até que os objetivos e procedimentos fiquem claros. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento.

O que é lipidoma?

O lipidoma consiste na identificação e quantificação de lipídeos (gordura) em um organismo sendo utilizado para avaliar a presença de vários tipos de lipídeos, como os lipídeos da inflamação (eicosanoides).

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Pretendemos avaliar a agregação plaquetária, dosar componentes relacionados a inflamação presentes no sangue, chamados de citocinas (hormônios produzidos pelas células que podem causar os sintomas vistos na malária) e lipídios (gordura), envolvidos em processos inflamatórios no sangue de pacientes com malária, infectados com *P. vivax*. Para esta avaliação serão coletadas duas vezes o seu sangue, totalizando em cada uma das coletas o máximo de 17 mL, sendo uma vez antes do tratamento (dia 0) e a outra ao final do tratamento (dia 28). Com isso, nosso estudo poderá ser utilizado como referência em outros estudos para avaliação da alteração da produção desses lipídeos em diversas doenças.

Para a comparação com os dados de pacientes com malária, precisamos também da coleta de sangue de pessoas saudáveis. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar no máximo 17 mL de sangue como descrito anteriormente. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial a sua saúde. Os riscos referentes a este estudo são considerados mínimos uma vez que as amostras serão coletadas por profissionais capacitados. Podendo ou não, causar um desconforto pela picada da agulha ou formar manchas roxas (hematomas) no local onde ocorreu a coleta de sangue.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento, e os mesmos serão informados dos resultados finais da pesquisa. Esta pesquisa não trará benefício diretamente para você, mas seus resultados poderão ajudar em pesquisas futuras. Você pode desistir a qualquer momento. Para desistir, você deverá entrar em contato com o pesquisador Péricles Gama Abreu Filho ou com o Comitê de Ética pelos telefones abaixo. Ao concordar em participar, você deverá assinar este termo em duas vias, uma para você e outra para os pesquisadores.

Será feita apenas uma doação de sangue para a pesquisa e não haverá armazenamento do material colhido, o mesmo será descartado ao final da pesquisa.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Péricles Gama Abreu Filho pelo telefone (92) 3236-2546 ou (92) 98232-1311. Telefone para contato do Comitê de Ética em Pesquisa (92) 2127-3572, e-mail do Comitê de Ética em Pesquisa: cep@fmt.am.gov.br

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 17 mL do meu sangue da veia do braço para a realização desta pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é demonstrar o cenário de produção de lipídeos e relacionar com a produção de citocinas em pacientes com malária infectados com *P. vivax*, e que este projeto possa ser utilizado como referência em pesquisas futuras para avaliação destes compostos em diversas doenças.

Manaus/AM, _____ de _____ de 20__.

RENOVAÇÃO DE TERMO DE
PROTEÇÃO DE DADOS PESSOAIS
DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Péricles Gama Abreu Filho

CPF: 013.042.512-50

Profa. Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

CPF: 070.717.068-08

Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi

CPF: 297.567.728-67

Sujeito da pesquisa

Apêndice 03: Questionário Estruturado

Questionário

Data e hora da coleta: _____

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Etnia: _____

Peso: _____

Apresenta alguma doença fora da doença de interesse do estudo?

() Não

() Sim Qual? _____

Toma ou tomou algum medicamento?

() Não

() Sim Qual? _____

- Qual posologia (dosagem, via de administração, intervalo de tempo, período de administração)?

- Quais os alimentos ingeridos no café da manhã (na data da coleta) e no jantar (dia anterior à coleta)?

- Consome peixes, aves ou mamíferos (porco, vaca entre outro)?

- Que tipo de óleo utiliza para Preparar suas refeições?

- Faz o uso de suplementação de ômega 3, 6 ou 9?

- Observações (Ex: cirurgias, PPD)

Possui Malária?

() Não (Indivíduo Controle)

() Sim (Seguir para a segunda parte do questionário)

Manifestações Clínicas

Parasitemia

() 1+ () 2++ () 3+++ () 4++++

Obs: Anexar junto a este questionário o hemograma e o lipidograma completo.



Plasma Eicosanoid Profile in *Plasmodium vivax* Malaria: Clinical Analysis and Impacts of Self-Medication

Péricles Gama Abreu-Filho^{1,2,3}, Andrea Monteiro Tarragô^{1,4}, Allyson Guimarães Costa^{1,4,5,6,7}, Wuelton Marcelo Monteiro^{5,6}, Alyne Fávero Galvão Meielles^{3,8}, Thainá Cristina Cardoso Costa^{4,7}, Jéssica Santos Silva⁴, Fabiana Albani Zambuzi^{2,3}, Luiz Gustavo Gardinassi³, Luiz Alberto Beraldo Moraes⁹, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda^{5,6,10}, Carlos Arterio Sorgi^{1,3}, Lúcia Helena Faccioli³ and Adriana Malheiro^{1,4,5,7*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, ² Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil, ³ Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil, ⁴ Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil, ⁵ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, ⁶ Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brazil, ⁷ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, ⁸ Programa de Pós-Graduação da Bioquímica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil, ⁹ Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil, ¹⁰ Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia, Manaus, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Wanderley De Souza,
Federal University of
Rio de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Sharvan Sehrawat,
Indian Institute of Science Education
and Research Mohali, India
Patricia Talamás-Rohana,
Center for Research and Advanced
Studies (CINVESTAV), Mexico

*Correspondence:

Adriana Malheiro
malheiroadriana@yahoo.com.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 12 February 2019

Accepted: 27 August 2019

Published: 18 September 2019

Citation:

Abreu-Filho PG, Tarragô AM, Costa AG, Monteiro WM, Meielles AFG, Costa TCC, Silva JS, Zambuzi FA, Gardinassi LG, Moraes LAB, Lacerda MVG, Sorgi CA, Faccioli LH and Malheiro A (2019) Plasma Eicosanoid Profile in *Plasmodium vivax* Malaria: Clinical Analysis and Impacts of Self-Medication. Front. Immunol. 10:2141. doi: 10.3389/fimmu.2019.02141

The participation of cytokines and chemokines in *Plasmodium vivax* malaria (Pv-malaria) activates the immune response and thus causes the production of several inflammatory mediators. This process is already well-established, but little is known about eicosanoids in malaria physiopathology, especially in regards to inflammation and immunity. Malaria is an acute febrile syndrome similar to any other less important infectious disease and people may self-medicate with any anti-inflammatory drugs in order to cease the recurrent symptoms of the disease. Based on this information, the study describes the eicosanoid profile and its possible influence on the production of cytokines and chemokines in *P. vivax* infections. In addition, we investigated the influence of self-medication with anti-inflammatory drugs in this immune profile. Twenty-three patients were included in the study, with or without self-medication by anti-inflammatory drugs prior to diagnosis. A total 12 individuals were selected for the control group. Eicosanoid profiles were quantified by HPLC-MS/MS, and cytokines and chemokines by flow cytometry and ELISA. The Pv-malaria infection significantly reduces the production of several lipid mediators, and its action is increased by self-medication. We observed that the eicosanoids we found derive from the lipoxygenase and cyclooxygenase pathways, and present positive and negative correlations with chemokines and cytokines in the follow-up of patients. Our data suggest that self-medication may interfere in the immunological characteristics in *P. vivax* infection and may modify the follow-up of the disease.

Keywords: eicosanoids, *Plasmodium vivax*, inflammatory mediators, cytokines, self-medication

INTRODUCTION

Malaria is one of the oldest infectious diseases on earth, and often leads to severe disease or even death (1). Caused by the Apicomplexa protozoans from *Plasmodium* genus, five species infect and cause disease in humans (*Plasmodium falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. vivax*) (2–4). Their transmission occurs via the bite of the female mosquito of the *Anopheles* genus (5). Approximately 216 million cases of malaria were diagnosed worldwide in 2016, with 445,000 deaths. In Brazil, 175,000 cases were reported in 2017. The Amazon region contributes to nearly 99% of the malaria notifications and *Plasmodium vivax* is responsible for most diagnosed cases (6–8).

The onset of the immune response occurs when the mosquito inoculates the sporozoites in the skin, which may be phagocytosed by dendritic cells and macrophages and presented to the lymphocytes (9). Hemolysis of red blood cells infected with *Plasmodium* is the main pathogenic mechanism observed during infection. Parasites release endotoxins known as hemozoin linked to parasitic DNA that bind to the Toll-like Receptor 9 (TLR-9) and activate the host immune response and the production of several inflammatory mediators against these pathogens (10, 11).

Eicosanoids are lipid mediators of local signaling, derived from arachidonic acid (AA), which participate in homeostatic and inflammatory processes (12, 13). Their production occurs when AA fuels enter three main metabolic pathways: the cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) pathway that produces prostaglandins (PGs) and thromboxanes (TXs); the lipoxygenases (5-LO, 12-LO, and 15-LO) pathway producing the leukotrienes (LTs), lipoxins (LPs), heptoxylines and hydroxyethylacetaenoic acids (HETEs); and the cytochrome P450 (CYP450) pathway that produces epoxyeicatriatrienoic acids (EETs), dihydroxyeicatriatrienoic acids (DiHETEs), and HETEs (14). The production of eicosanoids has already been documented in patients infected with *P. falciparum*, and studies suggest that low levels of plasma PGE₂ are associated with severe disease (15). Moreover, high concentrations of LTB₄ in mice infected with *Plasmodium berghei* were detrimental to the pathogenesis of cerebral malaria (16).

Previous studies have shown alterations in phospholipase A2 (PLA2) activity, which is involved in the glycerophospholipid metabolism, during *P. vivax* malaria episodes in human and in erythrocytes infected with *P. falciparum* (17). More recently, alterations in glycerophospholipid and glycosphingolipid metabolism was also observed in *P. vivax* malaria (18). Furthermore, metabolomic data suggest that the host response to *P. vivax* infection might be affected by metabolites involved in the degradation of heme and metabolism of several lipids, including oleic acid and omega-carboxytrienoleukotriene B₄ (19).

The Amazon region comprises the largest and most biodiverse part of the world's tropical forests. The Amazon region comprises the largest and most biodiverse part of the world's tropical forest. It is an endemic area for tropical and infectious diseases with similar clinical spectrum and severity, such fever, headache, and myalgia, favoring the maintenance of the self-medicate culture (20, 21). Because of this, self-medication is a common practice

in Brazil and involves the use of medicinal plants and medicines without a prescription. The aim of this research was to describe the profile of lipid mediators and its possible influence on the production of cytokines and chemokines in patients with *P. vivax* malaria (*Pv-malaria*), both in the phase acute and convalescent stage. The data from this research suggest that self-medication influences the production of eicosanoids in patients infected with *P. vivax* and results in a greater interaction between the studied inflammatory mediators.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The study was approved by the Research Ethics Committee at Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD process n° 1.358.078/15). All participants read and signed the written informed consent form, in accordance with the Declaration of Helsinki and Resolution 466/12 of the National Health Board for research involving human subjects.

Healthy Individuals and Patients

Twenty-three patients were included in this study. They were diagnosed with non-severe acute malaria caused by *P. vivax* via a thick blood smear and the diagnosis was confirmed by the 18S rRNA gene using the 7500 Fast qPCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) as described previously (22–24) at FMT-HVD, which is located in the city of Manaus, Western Brazilian Amazon. Of these 23, 14 patients reported self-medication with anti-inflammatory drugs prior to diagnosis (SM), and 9 patients stated that they did not take any type of medication until the time of confirmation of the disease (NSM). 12 patients returned to the hospital 28 days (D28) after admission. This period is known as the convalescent stage after-treatment (AT) and is characterized when the individual is not sick, but has not yet fully recovered. This is known as the transition phase between disease and total cure. A total of 12 individuals were selected for the control group, and comprised of healthy donors who lived in the same city and had no previous history of malaria. Exclusion criteria included: patients under 18 years of age, pregnant women, people belonging to the indigenous population, patients with co-infected or already receiving treatment for malaria. All study participants underwent serological screening recommended by all Brazilian blood banks and this was carried out at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) serology laboratory for the purpose of exclusion. The clinical and demographic data were acquired using a standardized questionnaire.

Collection, Processing and Transport of Biological Samples

Whole blood samples from healthy subjects and patients were collected in tubes containing EDTA (BD Vacutainer® EDTA K2 Franklin Lakes, New Jersey, USA) and tubes containing Sodium Heparin (Labor Import® São Paulo, Brazil). Samples were then stored in isolated boxes for biological material and transported to the laboratory, where samples collected with EDTA were

centrifuged in a refrigerated centrifuge (5702R, Eppendorf, Hamburg, DEU) for 5 min at 1,900 g. The obtained plasma was separated and placed in cryotubes and stored in a freezer at -80°C for further quantification of cytokines and chemokines.

Tubes containing sodium heparin were stimulated with $20\text{ }\mu\text{M}$ Thapsigargin (SIGMA-ALDRICH Life Science) for 20 min in a water bath at 37°C under agitation. After this period, the reaction was blocked in an ice bath, and the stimulated whole blood was centrifuged at 400 g for 20 min at 4°C . The acquired plasma ($300\text{ }\mu\text{L}$) was aliquoted into cryotubes and immediately frozen at -80°C (25). These frozen aliquots were transported on dry ice to the Laboratory of Inflammation and Immunology of Parasitoses (LIIP), located at the School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP-USP) and later submitted to high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

All samples were stored and discarded after the experiments, obeying the norms of Good Clinical and Laboratorial Practices (GCLP).

Preparation of Plasma Samples for HPLC-MS/MS

The extraction of the eicosanoids in the plasma samples was performed by the solid phase extraction (SPE) method. In summary, the 12-epi-LTB₄-d4 analyte acting as internal standard (PI) was added to the plasma samples, then these samples were denatured overnight with 1.5 mL of an ice-cold methanol/acetonitrile (1–1, v–v). The denatured proteins were removed by centrifugation at 400 g for 20 min at 4°C and the supernatants obtained ($\sim 1.2\text{ mL}$) were diluted in 14 mL of ultra-pure water to decrease the methanol/acetonitrile content to 15% between organic phase and aqueous phase. Purification of the eicosanoids was performed by a Waters[®] Extraction Manifold and Sep-Pak C18 cartridges, 500 mg sorbent, 2.8 mL, HyperSepTM (Thermo Scientific, USA). Samples were transferred to pre-activated cartridges with 2 mL of methanol and 2 mL of 0.1% (v–v) water/acetic acid solution. After elution of the plasma samples, 2 mL of water–0.1% acetic acid (v–v) was added to the cartridge to elute hydrophilic polar compounds and, finally, the eicosanoids adhered on C18 silica were eluted with 2 mL of methanol/0.1% acetic acid (v–v) solution. The solvent was removed under reduced pressure at speedvac, and $100\text{ }\mu\text{L}$ of methanol was added to the extract obtained and transferred to HPLC-MS/MS (25).

Qualitative and Quantitative Analysis of Eicosanoids by HPLC-MS/MS

For this type of analysis, an AcquityTM UPLC (Waters[®]) system was used consisting of a quaternary pump and automatic injector coupled to the Xevo TQ-S mass spectrometer with ESI ionization source equipped with Orthogonal Z-spray (Waters[®]). The chromatographic analyses were performed on an Ascentis EXPRESS C18 column ($100 \times 4.6\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$) using a flow rate of 0.6 mL/min at 25°C . Elution was done using a binary gradient

system consisting of water: acetonitrile: acetic acid (69.98–30.02, v–v–v) (Step A) and acetonitrile: isopropanol (70–30, v–v) (Stage B) with 0% B from 0 to 2 min, increasing to 15% B at 2 min, 20% B at 5 min, 35% B at 8 min, 40% B at 11 min, 100% B at 15 min and remained in this proportion up to 19 min. From this time up to 30 min, the gradient returned to the initial ratio for column conditioning. The ionization source operated in negative mode and by Multiple Reaction Monitoring (MRM). To optimize the MRM conditions, a standard solution of each eicosanoid at 100 ng/mL diluted in methanol/water/ammonium acetate (71–30–0.1, v–v–v) was infused into the MS at $10\text{ }\mu\text{L/min}$ and fragmented by dissociation induced by collision with argon in order to obtain the spectrum of the ion product of each analyte. After selection of the MRM transitions, the cone and collision energies were standardized through the direct infusion of the standards to obtain adequate sensitivity. The linearity was evaluated through a calibration curve, in triplicate, of plasma samples enriched with standard solutions of LTB₄, 6-trans-LTB₄, LTD₄, 11-trans-LTD₄, LTE₄, PGD₂, PGE₂, 20-OH-PGE₂, 15-keto-PGE₂, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, PGJ₂, 5-HETE, 12-HETE, 15-HETE, 20-HETE, (+) 11,12-DHET, 15-DHET, 5-Oxo-EETE, 11,12-EET, 5 (S), 6 (R) -DiHETE, LXA₄, and TXB₂ (Cayman Chemical) and extracted by the method described in the above item, of 5.0; 7.5; 15.0; 30.0; 50.0, and 75.0 ng/mL . A linearity curve was also constructed for LTB₄, 5-HETE, 12-HETE, and TXB₂ (Cayman Chemical) contemplating the following concentrations: 75.0; 150.0; 300.0; 450.0; 800.0, and 1000.0 ng/mL . The calibration graph was constructed by plotting the plasma concentration values of each eicosanoid on the abscissa axis and the ratio between the area of the peaks obtained for each mediator and the area of the PI on the axis of the ordinates. Data analysis was done via linear regression using the least squares method, where

TABLE 1 | Demographic, parasitological, and baseline clinical characteristics of Control Group (CG) and *Pv*-malaria patients that did Not Self-Medicate (NSM) and Self-Medicated (SM).

Variables	CG (n = 12)	Plasmodium vivax malaria		
		All (n = 23)	NSM (n = 9)	SM (n = 14)
Age (years, median [IQR])	33 [27–41]	39 [30–54]	39 [35–52]	43 [23–54]
Gender (male/female)	7/5	17/6	9/0	8/6
Parasitemia (number of copies/ μL , median [IQR])	–	127,574 [28,242–637,392]	236,429 [109,717–604,622]	68,602 [19,896–664,631]
First infection (yes/no)	–	5/18	1/8	4/10
Number of infections (median [IQR])	–	2 [2–9]	4 [2–9]	2 [1–6]
Headache (yes/no)	–	21/2	8/1	13/1
Fever (yes/no)	–	12/11	6/3	6/8
Myalgia (yes/no)	–	12/11	5/4	7/7
Chills (yes/no)	–	6/17	2/7	4/10

the area/concentration relation is expressed by the equation of the line ($y = ax + b$), where a is the angular coefficient and b is the linear coefficient of the line. The correlation coefficient (r) was also calculated from the experimental points, which is the parameter that estimates the linearity of the calibration curve. Masslynx 4.1 software (Micromass, Manchester, UK) was used for data acquisition and processing.

Quantification of Plasma Concentrations of Circulating Cytokines and Chemokines

The concentrations of chemokines (CXCL-8, CCL-2, CCL-5, CXCL-9, and CXCL-10) and circulating cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-17A) through the CBA (Cytometric Bead Array) BDTM Human Chemokine Kit and CBA (Cytometric Bead Array) BDTM Human Th1, Th2, Th17 Cytokine

kit, respectively. IL-1 β and IL-5 cytokines were quantified by ELISA (BD OptEIA II Human Kit, BD Biosciences Pharmingen, USA), following the manufacturer's instructions.

Statistical Analyses

Clinical, epidemiological, laboratory, lipid mediator, chemokine, and cytokine concentrations were tabulated and stored using Microsoft Excel[®] Software (2010 version for Windows). The descriptive analyses were presented in tables and graphs of frequency distribution, elaborated in GraphPad Prism 5.0 software (San Diego, CA, USA), taking into account that the data have a non-parametric distribution. The comparative analyses between the groups were performed using the Mann-Whitney (NSM vs. HD, SM vs. HD, NSM vs. SM) and Wilcoxon test (NSM and SM vs. AT), with significant values being set at $p < 0.05$. From analysis of the Spearman correlation between the

TABLE 2 | Hematological and Biochemical parameters of Control Group (CG) and *Pv*-malaria patients that did not Self-Medicate (NSM) and Self-Medicated (SM).

Variables	CG ^(a) (n = 12)	Plasmodium vivax malaria		p-value*
		NSM ^(b) (n = 9)	SM ^(c) (n = 14)	
RBC [#] (unit/mm ⁶ , median [IQR])	4.9 [4.5–5.1]	4.9 [4.6–5.2]	4.5 [4.2–4.9]	0.107
HB (g/dL, median [IQR])	14.0 [13.0–15.6]	14.4 [13.3–15.4]	12.9 [12.6–14.5]	0.075
HT (% , median [IQR])	41.3 [38.7–45.7]	41.3 [39.3–44.4]	38.4 [36.1–41.9]	0.047_{ab, bc}
MCV (fL, median [IQR])	86.1 [82.9–90.0]	85.7 [84.7–90.0]	85.8 [84.1–87.3]	0.921
MCH (pg, median [IQR])	29.4 [28.7–30.6]	30.2 [28.6–31.3]	29.7 [28.8–30.3]	0.871
MCHC (g/dL, median [IQR])	34.1 [33.3–34.9]	34.6 [34.1–35.0]	34.7 [34.3–34.8]	0.373
RDW (% , median [IQR])	13.4 [12.9–13.5]	14.0 [13.6–14.4]	13.6 [13.1–14.4]	0.048_{ab}
WBC (unit/mm ⁶ , median [IQR])	7.2 [6.5–8.3]	5.7 [4.6–7.1]	5.0 [4.2–6.6]	0.020_{ac}
Neu (unit/mm ⁶ , median [IQR])	4.2 [3.3–4.8]	3.7 [2.8–5.5]	3.3 [2.3–4.7]	0.454
Eos (unit/mm ⁶ , median [IQR])	0.3 [0.2–0.3]	0.1 [0.02–0.2]	0.1 [0.07–0.1]	0.004_{ab, ac}
Lym (unit/mm ⁶ , median [IQR])	2.4 [1.9–2.9]	1.0 [7.3–1.5]	0.9 [0.8–1.8]	0.001_{ab, ac}
Mon (unit/mm ⁶ , median [IQR])	0.5 [0.4–0.5]	0.4 [0.3–0.6]	0.3 [0.2–0.4]	0.031_{ac}
PLT (unit/mm ⁶ , median [IQR])	260 [207–329]	93.0 [54.0–121]	106 [87.8–179]	<0.0001_{ab, ac}
MPV (fL, median [IQR])	7.6 [7.1–8.4]	9.2 [7.7–10.1]	7.3 [7.0–8.6]	0.083
Total lipids (mg/dL, median [IQR])	635 [550–759]	577 [466–714]	549 [522–628]	0.172
Triglycerides (mg/dL, median [IQR])	173 [81.8–308]	109 [85.0–271]	153 [101–228]	0.916
Total cholesterol (mg/dL, median [IQR])	177 [145–207]	120 [101–193]	120 [93.5–131]	0.006_{ac}
HDL (mg/dL, median [IQR])	47.0 [39.5–52.8]	27.0 [7.0–38.5]	14.5 [8.8–36.5]	0.0003_{ab, ac}
LDL (mg/dL, median [IQR])	102 [78.3–120]	76.0 [21.5–118]	63.5 [48.8–69.0]	0.008_{ac}
VLDL (mg/dL, median [IQR])	35.5 [22.0–61.8]	21.0 [8.5–44.5]	30.5 [20.0–45.3]	0.326
Glucose (mg/dL, median [IQR])	109 [92.4–135]	94.0 [85.0–120.5]	93.5 [63.0–109]	0.234
Uric acid (mg/dL, median [IQR])	4.3 [3.6–5.9]	5.3 [4.6–5.7]	3.4 [0.0–4.4]	0.035_{bc}
Creatinine (mg/dL, median [IQR])	0.9 [0.8–1.0]	1.1 [0.9–1.1]	0.9 [0.7–1.0]	0.117
Urea (mg/dL, median [IQR])	30.2 [24.4–33.8]	33.2 [26.7–40.3]	28.5 [20.5–37.3]	0.511
GGT (U/l, median [IQR])	28.4 [22.2–65.2]	66.6 [23.3–146]	47.0 [36.3–160]	0.093
ALP (U/l, median [IQR])	77.8 [71.1–98.7]	84.1 [60.2–93.0]	85.5 [78.0–113]	0.322
AST (U/l, median [IQR])	32.9 [30.0–44.5]	39.8 [23.8–47.6]	29.5 [22.5–38.9]	0.333
ALT (U/l, median [IQR])	26.9 [22.6–39.3]	35.0 [18.0–44.1]	25.5 [19.0–39.9]	0.840
Total bilirubin (mg/dL, median [IQR])	0.3 [0.2–0.5]	1.1 [0.8–1.8]	1.5 [0.4–1.8]	0.018_{ac}
Direct bilirubin (mg/dL, median [IQR])	0.1 [0.1–0.2]	0.4 [0.2–0.7]	0.6 [0.2–0.7]	0.015_{ac}
Indirect bilirubin (mg/dL, median [IQR])	0.2 [0.1–0.3]	0.8 [0.5–1.1]	0.9 [0.2–1.1]	0.026_{ab, ac}

* Statistical analyses were performed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test in order to compare pairs; [#]RBC, Red blood cells; HB, Hemoglobin; HT, Hematocrit; MCV, Mean corpuscular volume; MCH, Mean corpuscular hemoglobin; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin Concentration; RDW, Red cell distribution width; WBC, White blood cells; Neu, Neutrophil; Eos, Eosinophil; Lym, Lymphocyte; Mon, Monocyte; PLT, Platelet; MPV, Mean platelet volume; HDL, High Density Lipoprotein; LDL, Low Density Lipoprotein; VLDL, Very Low Density Lipoprotein; GGT, Gamma Glutamyl Transferase; ALP, Alkaline Phosphatase; AST, Aspartate Aminotransferase and ALT, Alanine Aminotransferase.

biomarkers, the networks analysis and demonstration of the complex interactions between chemokine, cytokines, and lipid mediators were performed in all groups of this study using Cytoscape software 3.0.4 (Cytoscape Consortium San Diego, CA, USA). The thickness of the lines was adjusted to portray the strength and whether the type of correlations was positive or negative.

RESULTS

Demographic, Parasitological, and Baseline Clinical Characteristics of the Study Population

All subjects in this study reside in an area of intense malaria transmission. Although they are in contact with *P. vivax* malaria (*Pv*-malaria) transmission vectors, 28% of the recruited individuals were primo-infected. The median age between the control and *Pv*-malaria groups was similar (33 and 39 years [$p = 0.144$], respectively), with male subjects predominating (58 and 74% [$p = 0.450$], respectively). The average parasite load was 127,574 parasites/ μ L, and was similar among patients who did not Self-Medicate (NSM) and those

who Self-Medicated (SM) ($p = 0.361$). Furthermore, median of the number of infections was 2 episodes, without any difference between the *Pv*-malaria subgroups ($p = 0.303$). **Table 1** summarizes the demographic, parasitological, and clinical characteristics.

Hematological and Biochemical Parameters of *Pv*-Malaria Patients That Did Not Self-Medicate (NSM) and Self-Medicated (SM)

Table 2 summarizes the hematological and biochemical parameters which were evaluated in the subgroups of *Pv*-malaria and control group (CG). No significant differences were observed among patients than did not Self-Medicate (NSM) and Self-Medicated (SM), except for differences in hematocrit and uric acid concentrations. Furthermore, the CG had significantly higher/lower concentrations and numbers of hematocrit, red cell distribution width, white blood cells, eosinophil, lymphocyte, monocyte, mean platelet volume, platelet, total cholesterol, HDL, LDL, uric acid and total, direct and indirect bilirubin when compared to NSM and SM groups.

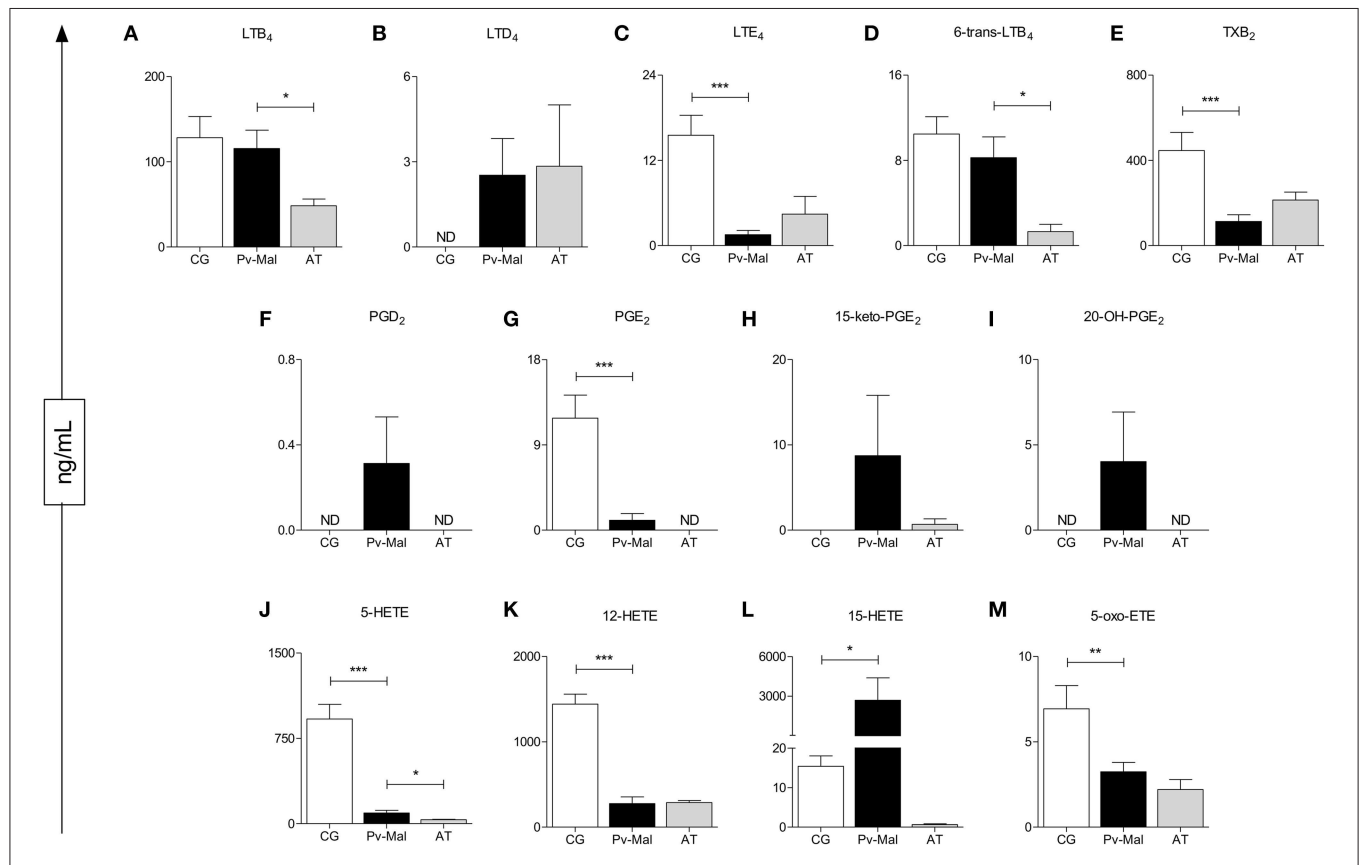


FIGURE 1 | Identification and quantification of eicosanoids after stimulation with Thapsigargin, from control group (white bar), *Pv*-malaria patients (black bar) and patients who returned 28 days after treatment, understood as the period of convalescence (gray bar). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ between groups studied. ND = Concentration not detected. The quantifications of these lipid mediators were measured using high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS).

Plasmatic Profile of Eicosanoids in *P. vivax* Malaria

Analysis of the plasmatic profile of eicosanoids after whole blood stimulation indicated that *P. vivax* infection may influence the serum concentrations of these biomolecules (Figure 1). The evaluation of these lipid mediators demonstrated a significant decrease of LTE₄, PGE₂, 5-HETE, 12-HETE, 5-Oxo-ETE, and TXB₂ (Figures 1C,E,I,J,L,M) in patients with *Pv*-malaria. In addition, increased levels of LTD₄, PGD₂, 15-keto-PGE₂, 20-OH-PGE₂, and 15-HETE were observed in these individuals (Figures 1B,E,G,H,K). We observed significantly lower concentrations of LTB₄, 6-trans-LTB₄, and 5-HETE when comparing the prior (*Pv*-malaria) and convalescent stage after-treatment (AT) patients (Figures 1A,D,I), with the increase of 12-HETE and TXB₂ (Figures 1J,M).

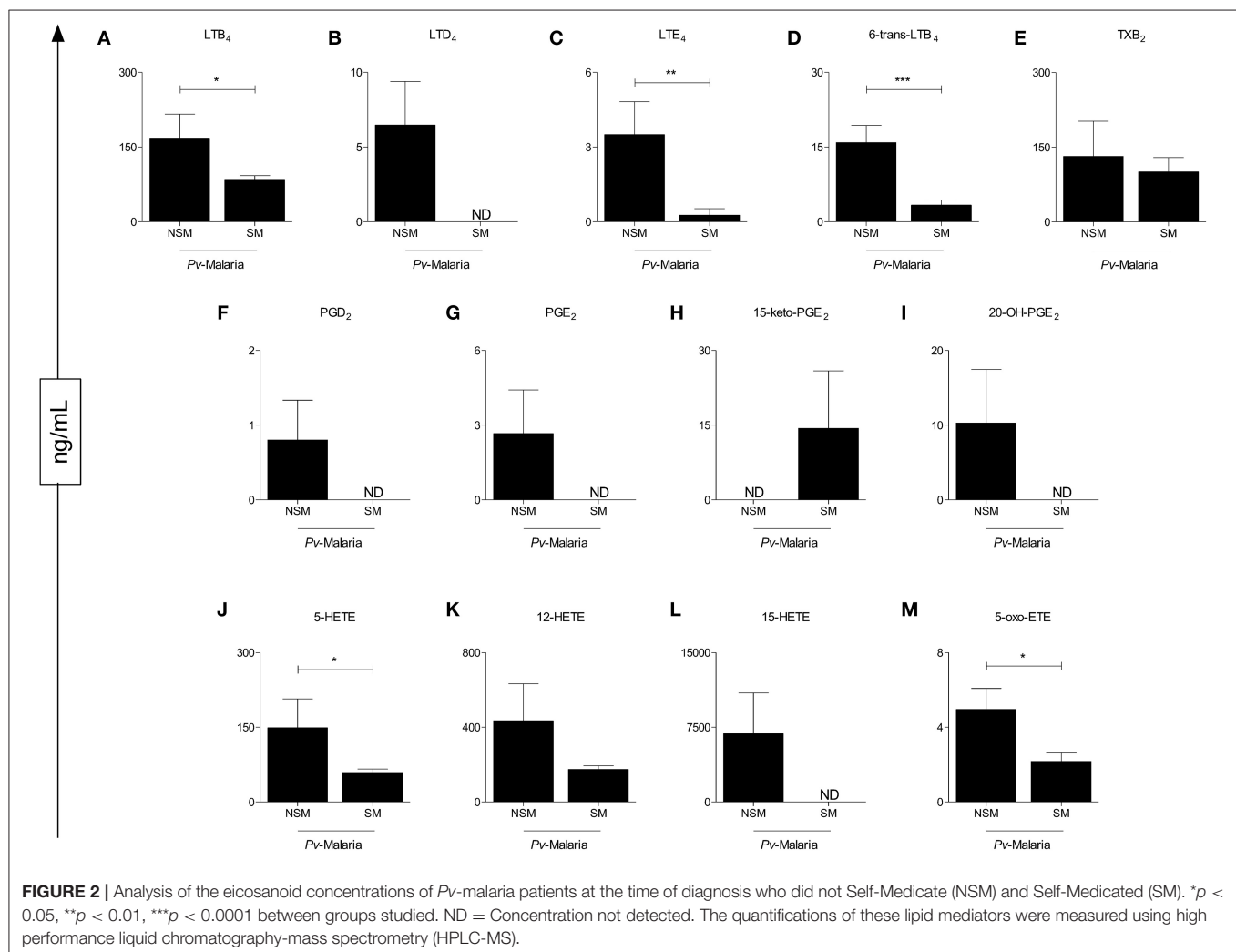
Influence of Self-Medication on the Circulating Concentration of Eicosanoids in *Pv*-Malaria

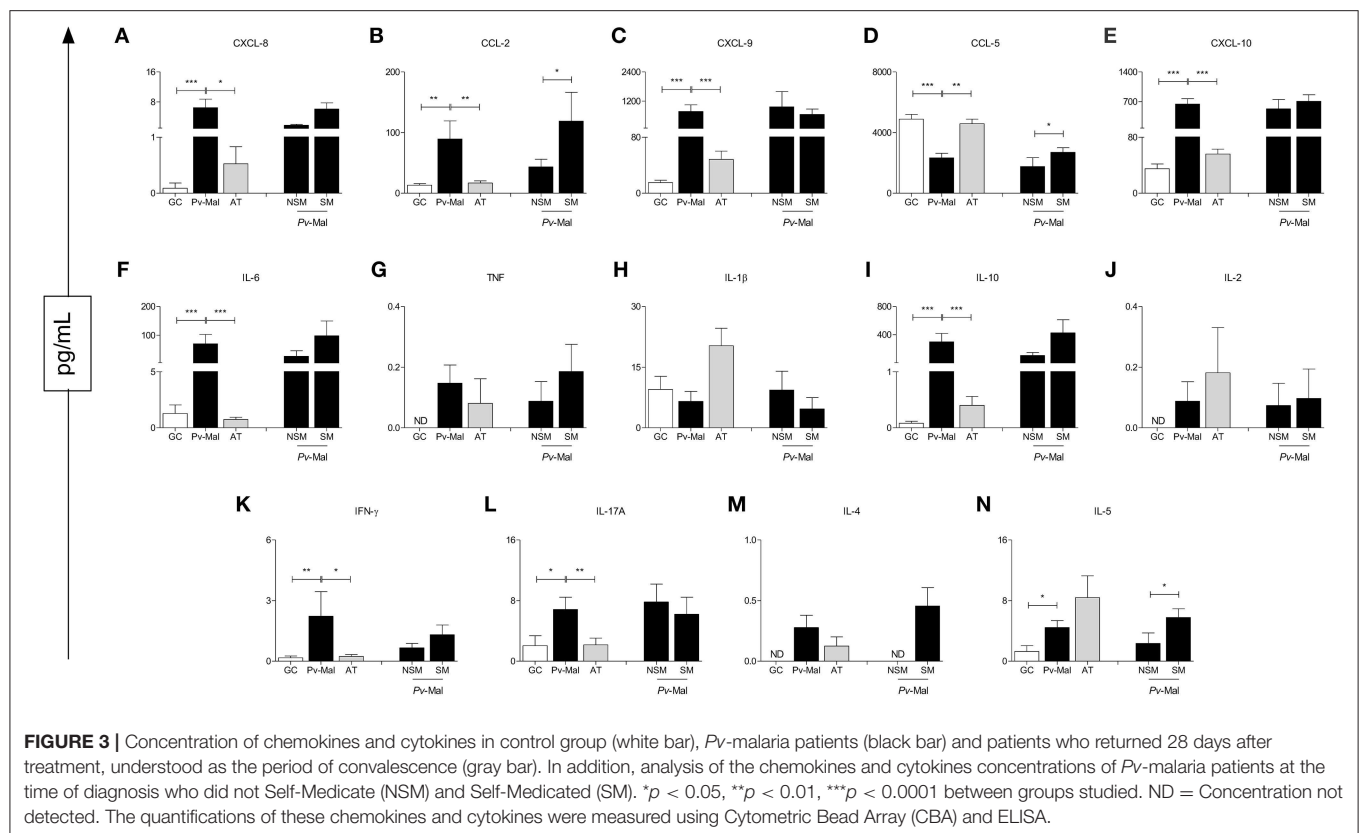
To understand the influence of self-medication on eicosanoid levels in *Pv*-malaria, we separated the patients into two groups:

No Self-Medication (NSM) and Self-Medication (SM) *Pv*-malaria patients (Figure 2). A significant reduction of LTB₄, LTE₄, 6-trans-LTB₄, 5-HETE, and 5-Oxo-ETE (Figures 2A,C,D,I,L) was observed in SM *Pv*-malaria patients. In addition, the eicosanoids LTD₄, PGD₂, PGE₂, 20-OH-PGE₂, and 15-HETE (Figures 2B,E,F,H,K) were not detected in these individuals. 12-HETE and TXB₂ were not significantly different between groups (Figures 2J,M).

Plasmatic Profile of Chemokines and Cytokines in *Pv*-Malaria and the Influence of Self-Medication in These Patients

Our data demonstrated that patients with *P. vivax* malaria presented chemokine and cytokine storms during infection (Figure 3). A significant increase of CXCL-8, CCL-2, CXCL-9, CXCL-10, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-17A, and IL-5 (Figures 3A–C,E,F,I,K,L,N) were observed in these patients. Although this phenomenon is observed at the end of the convalescence stage after treatment, the circulating levels reestablish themselves and reach the concentrations of the control group (Figure 3). To further





characterize these immunological markers, chemokine levels and plasma cytokines were analyzed in NSM and SM patients. It is observed that the use of the drugs positively influenced the production of CCL-2, CCL-5, and IL-5 (Figures 3B,D,N).

***Plasmodium vivax* Malaria and Self-Medication (SM) Change the Interaction of Eicosanoids, Chemokines, and Cytokines During Infection**

To evaluate the relationship between levels of eicosanoids, chemokines, and cytokines during *P. vivax* infection, a series of correlation analyses were performed (Figure 4). When comparing the analyzed interactions between molecules in the *Pv*-malaria and control group, there was an intense increase in relations, especially the chemokine (CXCL-8, CCL-2 and CXCL-10) and cytokines (IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-4, and IL-5) (Figure 4B). In addition, the number of interactions between the analyzed eicosanoids also increased during *P. vivax* infection, but this was not observed in the control group (Figure 4A). This phenomenon remains even in the convalescent stage after-treatment (Figure 4C). Finally, we performed the analysis of the correlation indices by categorizing patients with *Pv*-malaria in two different groups (NSM and SM) and observed that the interactions were influenced in individuals who self-medicated. Decreased eicosanoid ratios and

increased correlations with chemokines and cytokines were noted (Figure 4E).

DISCUSSION

In this study, we characterize the eicosanoid profile of patients with *Pv*-malaria during the acute phase and convalescent stage after-treatment. Moreover, we report the influence of self-medication on this profile. These findings are particularly relevant in order to better understand the interaction between inflammatory and lipid mediators during the cure of malaria-*vivax* infection. We demonstrate that *Pv*-malaria infection significantly affects the levels of metabolites derived from LO or COX pathways. Levels of these lipid mediators are tightly correlated with plasma levels of cytokines and chemokines that are related to clinical characteristics of the patients. Moreover, our data suggest that self-medication (SM) contributes to changes in the correlations between eicosanoids, chemokines, and cytokines during infection, which may aid in parasitic clearance and/or symptom alleviation. To our knowledge, this is the first study to comprehensively profile eicosanoid production and their associations with cytokines and chemokines during infections with *P. vivax*.

Plasmodium vivax infection induces inflammatory and regulatory processes that are designed to contain the parasite multiplication, while maintaining the integrity of tissues and organs (26–28). Although most patients with *P. vivax* malaria

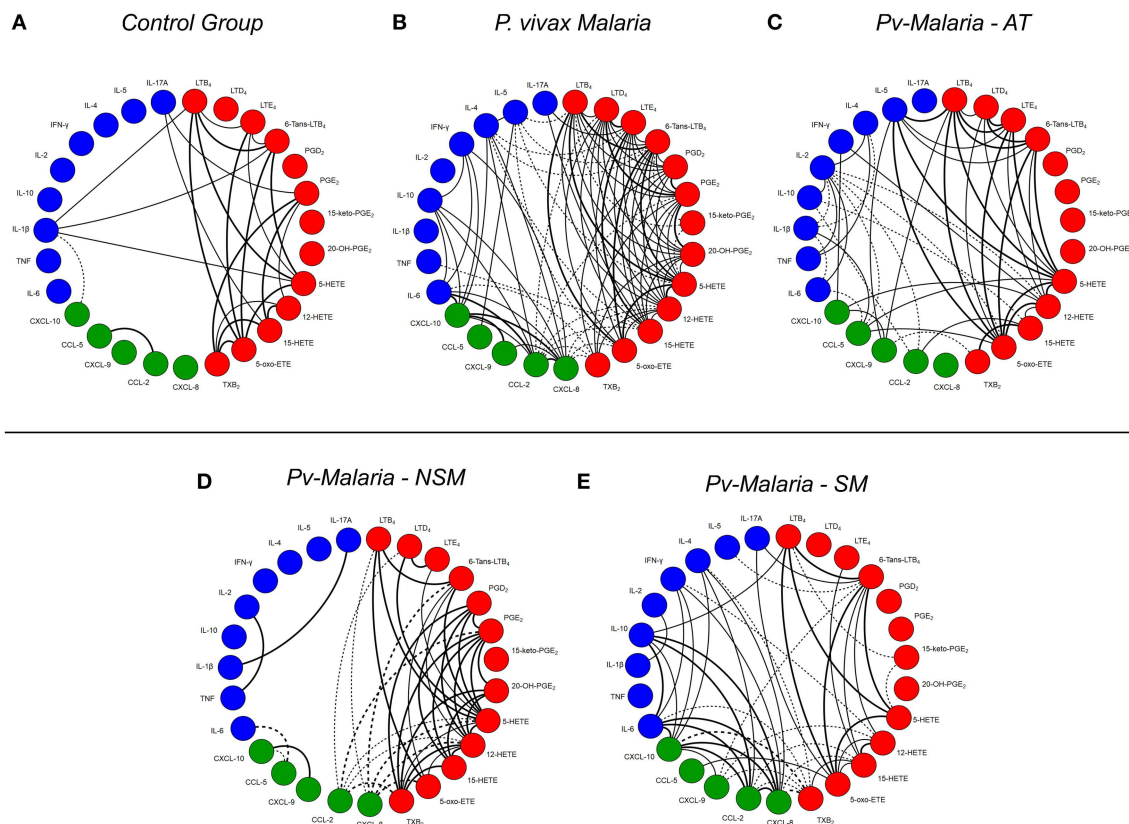


FIGURE 4 | A network of interaction between eicosanoids, chemokines and cytokines in control group, *Pv*-malaria patients, individuals who returned 28 days after treatment, understood as the period of convalescence and *Pv*-malaria patients at the time of diagnosis who did not Self-Medication (NSM) and Self-Medicated (SM). Each connecting line is a significant correlation between a pair of markers. Continuous lines represent positive correlations, while dashed lines represent negative correlations ($p < 0.05$). The degree of significance is represented by the thickness of the line. Correlations were obtained through the Spearman test; the value of r and p were used to classify the connections as weak ($r \leq 0.35$, $p < 0.05$), moderate ($r = 0.36-0.67$, $p < 0.01$) or strong ($r \geq 0.68$, $p < 0.0001$). The absence of the line indicates the non-existence of the relationship.

exhibit mild clinical symptoms, severe cases are reported and have been associated with elevated levels of TNF- α , IFN- γ and low levels of PGs, TXBs, and IL-10 (29–33). Our data further extend these findings by demonstrating reduced a production of PGE₂ even during mild cases of *P. vivax* infection. PGE₂ suppresses type I interferon responses, while *P. vivax* infection promotes robust transcriptional interferon signatures, which are associated with linoleate metabolism (34) and a pathway that influences arachidonic acid biosynthesis. Furthermore, TXB₂, an inactive product derived from TXA₂, was also reduced during *P. vivax* infection and might reflect the degree of thrombocytopenia in these patients (35). This is further supported because treatment recovered platelet counts, while only levels of TXB₂ increased during convalescence.

Treatment down-regulated the lipoxygenase pathways, reducing the production of LTB₄, 6-trans-LTB₄, 5-HETE, and 12-HETE. Except for the last lipid mediator which is exclusively produced by action of 12-LO, since formation of the other eicosanoids involves reactions catalyzed by 5-LO. All these metabolites were negatively correlated with the Th2 cytokine profiles, IL-4 and/or IL-5. After-treatment changed these

correlations, whereby IL-5 became positively correlated with LTB₄, 6-trans-LTB₄ and 5-HETE. IL-5 signaling has been shown to promote 5-LO activating protein (FLAP) expression and 5-LO activation and nucleus translocation (36). Self-medication reduced the production of these mediators, whose 6-trans-LTB₄ was also negatively correlated with IL-5. These data highlight an underlying association between Th2 cytokine profiles and LOX products that can be relevant to the treatment of *P. vivax* malaria. A recent study has demonstrated that a major product of LTB₄ catabolism by neutrophils, omega-carboxy-tinor-LTB₄, is significantly associated with *P. vivax* parasite burden, which suggests that the production of eicosanoids might also be affected by clinical parameters such as the degree of parasitemia (19).

We observed little association between the production of eicosanoids and circulating cytokines in the control group, but, in particular, IL-1 β was positively correlated with levels of LTB₄, 6-trans-LTB₄, and 5-HETE. This is interesting because depending on the context, LTB₄ exerts a regulatory role over IL-1 β production (37, 38). This suggests that 5-LO activity might also be important in order to limit IL-1 β release

during homeostatic state, of which levels increased during convalescence, when 5-LO metabolites were also reduced. After *P. vivax* infection, there were no significant correlations with IL-1 β , which did not recover after treatment. However, further sub-classification of patients demonstrated that IL-1 β positively correlated with IL-17 during infection of NSM patients but not SM patients, although both groups exhibited similar levels of these cytokines. This is consistent with the role of IL-1 β for the differentiation and polarization of naïve T lymphocytes into Th17 cells (39), whereas lack of correlation after self-medication suggests a disruption in this process. Levels of IFN- γ and the related chemokine, CXCL-10, increased after *P. vivax* infection. IFN- γ did not correlate with lipid mediators during acute infection for all patients, but self-medication changed this profile, showed inverse correlations between IFN- γ and 12-HETE in the interaction network between immunological molecules and lipid mediators (Figure 4). During convalescence, significant correlations were also observed between IFN- γ , CXCL-10, and 12-HETE, suggesting a potential cross-talk between these mediators.

The local population is very well-informed about malaria and knows the need for diagnosing malaria at the onset of the disease. However, the study has limitations since eicosanoids, chemokines, and cytokines were not evaluated at the onset of infection and/or symptoms. Furthermore, the small sample size does not allow intra-comparison of the eicosanoids, chemokines, and cytokines with clinical manifestations of *Pv*-malaria, including in asymptomatic and severe malaria.

CONCLUSION

In summary, *P. vivax* infection triggers production of immune and lipid mediators, generally influencing the increase of these molecules in the acute stage of the disease. Our data also suggest that after antimalarial treatment, the serum levels of these molecules are reestablished. Furthermore, self-medicated individuals had a significant impact on the production of lipid mediators, chemokines and cytokines, altering the interaction dynamics between these molecules in *Pv*-malaria infection. Finally, we believe that self-medication deserves more attention

during disease follow-up, since most of the drugs consumed are exempt from prescription, but aren't exempt from risk.

DATA AVAILABILITY

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

All protocols and consent forms were approved by the Research Ethics Committee at the FMT-HVD (CEP/FMT-HVD process #1.358.078/2015). Patients were treated according to recommendations of the Brazilian Health Ministry.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PA-F, AT, AC, LG, LF, and AM designed and performed the experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. PA-F and AC analyzed data. AFGM, TC, FZ, LG, and LM performed the experiments. CS analyzed the data and revised the manuscript. PA-F, WM, ML, LF, and AM conceived and supervised the project, designed the experiments, interpreted the data, wrote and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

Financial support was provided by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). PA-F, FZ, and TC have fellowship from CAPES and FAPEAM (Ph. D. and Masters student). AC has a fellowship from CAPES (PNPD/CAPES program). ML and LF are level 1 research fellows from CNPq. AM and WM are level 2 research fellows from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: biology and disease. *Cell*. (2016) 167:610–24. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055
2. Ministério da Saúde (BR). *Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da Malária: manual para profissionais de Saúde na Atenção Básica*. Brasília: Ministério da Saúde (Série, A. Normas e manuais técnicos) (2006).
3. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, et al. Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. (2008) 46:165–71. doi: 10.1086/524888
4. Crawley J, Chu C, Mtove G, Nosten F. Malaria in children. *Lancet*. (2010) 375:1468–81. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60447-3
5. The beast in the mosquito: the correspondence of Ronald Ross and Patrick Manson. *Clio Med*. (1998) 51:1–528.
6. World Health Organization. *World Malaria Report*. Geneva (2017).
7. Ministério da Saúde (BR). *Secretaria de vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 e 2013*. Brasília: Boletim Epidemiológico (2015).
8. Brazilian Ministry of Health. *Secretaria de Vigilância em Saúde*. Brasília: Boletim Epidemiológico (2017)
9. Sinnis P, Zavala F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. *Semin Immunopathol*. (2012) 34:787–92. doi: 10.1007/s00281-012-0345-5
10. Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*, 23, 69–99 (2005) doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115638
11. Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, Latz E, Monks BG, Visintin A, et al. Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2007) 104:1919–24. doi: 10.1073/pnas.0608745104

12. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. (2001) 294:1871–5. doi: 10.1126/science.294.5548.1871
13. Buczynski MW, Dumlao DS, Dennis EA. Thematic review series: proteomics. an integrated omics analysis of eicosanoid biology. *J Lipid Res*. (2009) 50:1015–38. doi: 10.1194/jlr.R900004-JLR200
14. Tam VC. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. *Semin Immunol*. (2013) 25:240–8. doi: 10.1016/j.smim.2013.08.006
15. Perkins DJ, Kremsner PG, Weinberg JB. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. (2001) 183:113–8. doi: 10.1086/317660
16. Xiao L, Patterson PS, Yang C, Lal AA. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. (1999) 60:668–73. doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.668
17. Zidovetzki R, Sherman IW, Cardenas M, Borchardt DB. Chloroquine stabilization of phospholipid membranes against diacylglycerol-induced perturbation. *Biochem Pharmacol*. (1993) 45:183–9. doi: 10.1016/0006-2952(93)90391-9
18. Uppal K, Salinas JL, Monteiro WM, Val F, Cordy RJ, Liu K, et al. Plasma metabolomics reveals membrane lipids, aspartate/asparagine and nucleotide metabolism pathway differences associated with chloroquine resistance in *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0182819. doi: 10.1371/journal.pone.0182819
19. Gardinassi LG, Cordy RJ, Lacerda MV G, Salinas JL, Monteiro WM, Melo GC, et al. Metabolome-wide association study of peripheral parasitemia in *Plasmodium vivax* malaria. *Int J Med Microbiol*. (2017) 307:533–41. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.09.002
20. Valdir Veiga. Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State: acceptance by health professionals, way of use of the population. *Brazil J Pharmacog*. (2008) 18:308–13. doi: 10.1590/S0102-695X2008000200027
21. Arrais PS, Fernandes ME, Pizzol TD, Ramos LR, Mengue SS, Luiza VL, et al. Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. *Rev Saude Publica*. (2016) 50(Suppl. 2):13. doi: 10.1590/s1518-8787.2016050006117
22. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman PA, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J*. (2010) 9:361. doi: 10.1186/1475-2875-9-361
23. Wampfler R, Mwingira F, Javati S, Robinson L, Betuela I, Siba P, et al. Strategies for detection of *Plasmodium* species gametocytes. *PLoS ONE*. (2013) 8:e76316. doi: 10.1371/journal.pone.0076316
24. Costa AG, Ramasawmy R, Ibiapina HN S, Sampaio VS, Xábregas LA, Brasil LW, et al. Association of TLR variants with susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria and parasitemia in the Amazon region of Brazil. *PLoS ONE*. (2017) 12:e0183840. doi: 10.1371/journal.pone.0183840
25. Galvão AF, Petta T, Flamand N, Bollela VR, Silva CL, Jarduli LR, et al. Plasma eicosanoid profiles determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in stimulated peripheral blood from healthy individuals and sickle cell anemia patients in treatment. *Anal Bioanal Chem*. (2016) 408:3613–23. doi: 10.1007/s00216-016-9445-8
26. da Costa AG, Antonelli LR, Costa PA, Pimentel JP, Garcia NP, Tarragó AM, et al. The robust and modulated biomarker network elicited by the *Plasmodium vivax* infection is mainly mediated by the IL-6/IL-10 axis and is associated with the parasite load. *J Immunol Res*. (2014) 2014:318250. doi: 10.1155/2014/318250
27. Costa AG, Ramasawmy R, Val FFA, Ibiapina HNS, Oliveira AC, Tarragó AM, et al. Polymorphisms in TLRs influence circulating cytokines production in *Plasmodium vivax* malaria: TLR polymorphisms influence cytokine productions in malaria-vivax. *Cytokine*. (2018) 110:374–80. doi: 10.1016/j.cyto.2018.04.008
28. Mendonça VR, Queiroz AT, Lopes FM, Andrade BB, Barral-Netto M. Networking the host immune response in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. (2013) 12:69. doi: 10.1186/1475-2875-12-69
29. Anyona SB, Kempaiah P, Raballah E, Davenport GC, Were T, Konah SN, et al. Reduced systemic bicyclo-prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *Am J Hematol*. (2012) 87:782–9. doi: 10.1002/ajh.23253
30. Wilson NO, Jain V, Roberts CE, Lucchi N, Joel PK, Singh MP, et al. CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. *Dis Markers*. (2011) 30:39–49. doi: 10.1155/2011/828256
31. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Cláudio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. (2010) 9:13. doi: 10.1186/1475-2875-9-13
32. Daniel-Ribeiro CT, Lacerda MV, Oliveira-Ferreira J. [*Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon, some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses]. *Bull Soc Pathol Exot*. (2008) 101:243–8.
33. Obata T, Nakano Y, Looareesuwan S, Ohtomo H, Aikawa M. Prostaglandin spectrum in falciparum malaria patients. *Int Congress Series*. (2002) 1233:475–8. doi: 10.1016/S0531-5131(02)00244-3
34. Gardinassi LG, Arévalo-Herrera M, Herrera S, Cordy RJ, Tran V, Smith MR, et al. Integrative metabolomics and transcriptomics signatures of clinical tolerance to *Plasmodium vivax* reveal activation of innate cell immunity and T cell signaling. *Redox Biol*. (2018) 17:158–70. doi: 10.1016/j.redox.2018.04.011
35. Coelho HC, Lopes SC, Pimentel JP, Nogueira PA, Costa FT, Siqueira AM, et al. Thrombocytopenia in *Plasmodium vivax* malaria is related to platelets phagocytosis. *PLoS ONE*. (2013) 8:e63410. doi: 10.1371/journal.pone.0063410
36. Cowburn AS, Holgate ST, Sampson AP. IL-5 increases expression of 5-lipoxygenase-activating protein and translocates 5-lipoxygenase to the nucleus in human blood eosinophils. *J Immunol*. (1999) 163:456–65.
37. Zoccal KF, Gardinassi LG, Sorgi CA, Meirelles AF G, Bordon KC F, Glezer I, et al. CD36 shunts eicosanoid metabolism to repress CD14 licensed interleukin-1 β release and inflammation. *Front Immunol*. (2018) 9:890. doi: 10.3389/fimmu.2018.00890
38. Zoccal KF, Ferreira GZ, Prado MKB, Gardinassi LG, Sampaio SV, Faccioli LH. LTB $_4$ and PGE $_2$ modulate the release of MIP-1 α and IL-1 β by cells stimulated with *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. (2018) 150:289–96. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.06.066
39. Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. (2009) 30:576–87. doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.007

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Abreu-Filho, Tarragó, Costa, Monteiro, Meielles, Costa, Silva, Zambuzi, Gardinassi, Moraes, Lacerda, Sorgi, Faccioli and Malheiro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.