KARIN KIRCHGATTER

***Plasmodium vivax* : CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RECAÍDAS
UTILIZANDO UM SEGMENTO POLIMÓRFICO DO GENE MSP1 COMO
MARCADOR GENÉTICO**

**Dissertação apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de
Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Biologia
da Relação Patógeno Hospedeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Hernando
Antonio del Portillo**

SÃO PAULO

1997

Aos meus pais, minhas avós e meus irmãos, pelo apoio e estímulo em todas as horas.

Ao Nilton, pela compreensão e pelo carinho nas horas mais difíceis .

Aos pacientes com malária, em especial àqueles que fizeram este estudo possível.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hernando Antonio del Portillo, pela proposta de realização deste estudo e pelo esforço na obtenção dos recursos necessários.

À Dra. Marcia Caraça Cortás, ex-Superintendente da SUCEN, ao Dr. José Carlos Seixas, atual Superintendente da SUCEN, e ao PqC José Carlos Rehder de Andrade, Diretor da Divisão de Programas Especiais, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

À PqC Silvia Maria Fátima Di Santi, pela oportunidade que me concedeu de realizar este estudo e pelo apoio nas horas mais difíceis.

À Márcia Aparecida Sperança, pelo auxílio nas técnicas de biologia molecular e pela eterna disposição em dirimir minhas dúvidas.

À Dra. Gabriela Levitus, pelo auxílio nos ensaios imunoenzimáticos e à Lida Mancilla, pelos clones para produção das proteínas de fusão.

Ao Prof. Dr. Maurício Rodrigues e à Irene Soares, pelos anticorpos para detecção das subclasses de IgG.

À PqC Maria Cecília Goy Porto Alves, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Marcelo Barcinski e aos membros de seu laboratório, por facilitarem a utilização da leitora de ELISA.

À Camila Indiani de Oliveira e à Maria José Menezes, pelo auxílio na técnica de western blot e pela colaboração na produção e purificação das proteínas de fusão.

À Anamaria Aranha Camargo, pela revisão de material e métodos.

À Myrna Garcia Serrano, pelo auxílio gráfico e sobretudo pela amizade verdadeira.

À Christina Rita de Camillo Toniolo, Sandra Maria Gomes e às bolsistas do Laboratório de Malária da SUCEN, pela colaboração no diagnóstico e na triagem dos pacientes.

À Otacília da Rocha, Alessandro Thosi Moretti e Aparecida Fonseca do Nascimento, pelo preparo do material de laboratório utilizado e pela higienização das áreas de trabalho.

Ao Mário Bressan e ao Edson Roberto da Silva, pelo auxílio na área de informática.

Aos colegas que participaram de alguma forma deste trabalho, pela colaboração valiosa.

Aos demais colegas do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Malária da SUCEN, pela agradável convivência.

Este estudo contou com apoio financeiro da FAPESP (94/0227-2), INCO-DC Programme (TS3-CT93/0229) e Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN).

ABREVIATURAS

aa - aminoácidos

amp - ampicilina

CSP - Proteína Circumsporozoíta

dATP - desoxiadenosinatrifosfato

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNAse - desoxirribonuclease

DO - densidade óptica

DP - desvio padrão

EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético

ELISA - Ensaio imunoenzimático

GST - glutathione-s-transferase

ICB - Bloco conservado entre espécies

IFA - Ensaio de imunofluorescência indireta

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - isopropil 2-D-tiogalactopiranosídeo

kb - kilobase

kDa - kiloDalton

LB - meio de cultura Lúria - Bertani

MSP1 - Proteína de Superfície do Merozoíta 1

P5 - Segmento Polimórfico 5 da PvMSP1

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

RNAse - ribonuclease

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SSCP - polimorfismo de conformação de simples fita

TEMED - N,N,N',N' - tetrametil-etilenodiamina

tet - tetraciclina

TMB - 3, 3', 5, 5' - tetrametilbenzidina

Tris - Tris -(hidroximetil) - aminometano

UV - luz ultravioleta

RESUMO

Plasmodium vivax é a espécie de malária humana de maior distribuição geográfica, com 35 milhões de casos por ano. No Brasil, é a espécie mais prevalente, sendo responsável por cerca de 70% dos casos de malária. Diferentemente do *P. falciparum*, o *P. vivax* apresenta hipnozoítas, formas que se mantêm em estágio dormente no fígado e que, após um período de tempo variável, por mecanismos ainda desconhecidos, causam novo ataque malárico denominado recaída. Para contribuir para um melhor conhecimento acerca das recaídas causadas por *P. vivax*, neste trabalho foram analisadas amostras pareadas referentes ao ataque primário e à recaída de 10 pacientes que se infectaram na Amazônia Brasileira. Através da amplificação de um segmento polimórfico do gene que codifica a Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (PvMSP1), foi encontrado um índice de 40% de infecções mistas, presentes inclusive durante a recaída, indicando que a ativação de hipnozoítas não é clonal. Em análise mais detalhada deste segmento polimórfico, utilizando técnicas de clonagem e sequenciamento, foi possível verificar que a população de parasitas obtida durante o ataque primário é idêntica àquela que surge nas recaídas. O estudo da resposta IgG específica naturalmente adquirida contra a região C-terminal da PvMSP1, a mais imunogênica da molécula, demonstrou, durante a recaída, um aumento nos títulos acompanhado por uma maturação na afinidade destes anticorpos além de um predomínio de IgG₁.

ÍNDICE

pg.

ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Situação da Malária	02
1.1.1. No Mundo	02
1.1.2. No Brasil	03
1.1.3. No Estado de São Paulo	04
1.2. Características Gerais da Malária	05
1.3. Recaídas	07
1.3.1. Definição	07
1.3.2. História das Recaídas	08
1.3.3. Frequência das Recaídas	12
1.4. Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (MSP1)	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Pacientes	19
3.1.1. Amostras	19
3.1.2. Medicação Utilizada	19
3.2. Extração do DNA Genômico	20
3.3. Amplificação de DNA	21

3.4. Gel de Agarose e Southern Blot	21
3.5. Preparo de Sondas Radioativas	22
3.6. Clonagem de DNA	22
3.6.1. Digestão do Fragmento de PCR com Enzima de Restrição	22
3.6.2. Purificação de DNA do Gel de Agarose	23
3.6.3. Ligação do Fragmento Digerido ao Vetor	23
3.6.4. Preparo e Transformação de Células Competentes	24
3.6.5. Métodos de Detecção de Clones Recombinantes	25
3.6.5.1. Extração de DNA Plasmidial e Digestão com Enzima de Restrição	25
3.6.5.2. Hibridização	26
3.7. Sequenciamento de DNA	26
3.7.1. Preparo da Amostra para Sequenciamento	26
3.7.2. Reação de Sequenciamento	27
3.7.3. Preparo do Gel de Sequenciamento	27
3.7.4. Eletroforese e Autoradiografia	27
3.8. Teste Imunoenzimático (ELISA)	28
3.8.1. Preparo das Proteínas de Fusão	28
3.8.1.1. Preparo de Células Competentes	28
3.8.1.2. Transformação de Células Competentes	28
3.8.1.3. Expressão e Purificação das Proteínas de Fusão	28
3.8.2. Padronização	29
3.8.3. Descrição da Reação	30
3.8.4. Determinação dos Títulos Contra P5 e a Região C-terminal	30
3.8.5. Determinação das Subclasses de IgG Contra a Região C-terminal	31

3.8.6. Ensaio de Afinidade dos Anticorpos Contra a Região C-terminal	31
3.9. Análise Estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Amostras	34
4.2. Amplificação de DNA e Southern Blot	36
4.3. Clonagem e Sequenciamento de DNA	38
4.4. Teste Imunoenzimático (ELISA)	41
4.4.1. Padronização	41
4.4.2. Determinação dos Títulos Contra P5 e a Região C-terminal	43
4.4.3. Determinação das Subclasses de IgG Contra a Região C-terminal	48
4.4.4. Ensaio de Afinidade dos Anticorpos Contra a Região C-terminal	50
5. DISCUSSÃO	55
6. ANEXOS	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1. Situação da Malária

1.1.1. No Mundo

A malária é a doença parasitária de maior importância e prevalência da atualidade. Ocorre principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo que 36% da população mundial vive em áreas de risco (WHO, 1996). Anualmente, estima-se que ocorram 300 a 500 milhões de casos clínicos e 1,5 a 2,7 milhões de pessoas morrem por complicações decorrentes da malária, principalmente no continente africano, sendo 1 milhão de crianças menores de 5 anos de idade. A Organização Mundial de Saúde listou 90 países ou territórios como endêmicos para a malária, sendo que, fora do continente africano, 2/3 da malária se concentra em apenas 6 países. Por ordem crescente de incidência de malária estes países são: Ilhas Salomão, Colômbia, Vietnã, Sri Lanka, Brasil e Índia.

Com 35 milhões de casos por ano (GALINSKI & BARNWELL, 1996), o *Plasmodium vivax* é o segundo maior patógeno responsável pela malária em humanos e é também a espécie de maior distribuição geográfica, visto que o *P. falciparum* se restringe a determinadas regiões do globo, principalmente ao continente africano. Na América Central e México, responsáveis por 17% da malária que ocorre nas Américas, quase 100% dos casos são causados por *P. vivax* (WHO, 1996). Já a região andina, que abrange os países de Venezuela, Colômbia, Peru, Equador e Bolívia, origina 32% dos casos de malária das Américas, sendo quase 80% destes causados por *P. vivax*.

1.1.2. No Brasil

O Brasil é responsável por 47% dos casos de malária registrados nas Américas (WHO, 1996). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o risco de se adquirir malária na Amazônia Brasileira em termos de incidência por 1000 habitantes é de 25, o 4º índice das Américas.

Dos casos registrados no Brasil, 99% concentram-se na Região Amazônica, sendo os estados de Pará, Rondônia e Mato Grosso, os responsáveis por mais de 60% dos casos que ocorrem no país (BRASIL, 1996). O número oficial de casos de malária por ano situa-se por volta de meio milhão, sendo 0.5% letal, mas estima-se que ocorram um milhão de casos, com letalidade de 1 a 2%.

No que diz respeito à espécie de plasmódio detectada, até 1983 o *P. vivax* teve maior frequência relativa (SÃO PAULO, 1995). Entretanto, por motivos ainda pouco esclarecidos, de 1984 a 1988, o *P. falciparum* apresentou ligeiro predomínio sendo detectado em mais de 50% das lâminas positivas. Então, desde 1988, quando ocorreu nova inversão da fórmula parasitária, o *P. vivax* tem sido a espécie predominante no Brasil, sendo que em 1995 foi responsável por 64,6% dos casos (BRASIL, 1996).

1.1.3. No Estado de São Paulo

O estado de São Paulo não é considerado área com transmissão ativa de malária, sendo registrados poucos casos autóctones anualmente (23 em 1995), com 90% destes ocorrendo nas regiões de Taubaté, São Vicente, Grande São Paulo e Sorocaba (SÃO PAULO, 1995). Essas regiões possuem municípios com Mata Atlântica preservada e, portanto, plantas da família Bromeliaceae, que funcionam como criadouros de anofelinos do subgênero *Kerteszia*. A malária associada a estes vetores apresenta quadro bem específico. O agente etiológico é sempre caracterizado como *P. vivax*, as parasitemias são baixas, o indivíduo desenvolve quadro assintomático ou com sintomas moderados e a transmissão ocorre geralmente de forma isolada.

Os casos importados da Região Amazônica representam 96% do total de casos registrados no estado. De 1993 a 1994 ocorreu um aumento de 17% no número de casos registrados no Brasil e um decréscimo de apenas 1% de 1994 para 1995. Entretanto, a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), órgão responsável pelo diagnóstico, tratamento e controle da malária no estado de São Paulo, vem registrando anualmente um decréscimo por volta de 10% no número de casos, provavelmente em virtude das condições sócio-econômicas do país, que dificultam o deslocamento do paciente para fora da área endêmica exclusivamente para tratamento de malária (SÃO PAULO, 1995).

No estado de São Paulo, em 1995, foram registrados 584 casos de malária, sendo 71,7% diagnosticados como *P. vivax*, 24,5% *P. falciparum* e 3,8% *P. vivax* associado a *P. falciparum* (fonte SUCEN).

Já na capital do estado, o Laboratório de Malária da Divisão de Programas Especiais, registrou 206 casos em 1995, sendo 72,3% *P. vivax*, 25,7% *P. falciparum* e 1,9% *P. vivax* associado a *P. falciparum*. Os estados de

Rondônia, Mato Grosso e Pará foram responsáveis por 75% dos casos (fonte SUCEN).

1.2. Características Gerais da Malária

A malária é uma doença parasitária transmitida na natureza pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium*, Classe Sporozoa, e caracteriza-se por acessos de febre com intervalos determinados, dependendo da espécie de *Plasmodium* envolvida. Quatro espécies causam a doença no homem: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*. No Brasil, somente três espécies de *Plasmodium* são encontradas: *P. vivax* e *P. falciparum*, agentes da febre terçã, cujos acessos ocorrem a cada 48 horas e *P. malariae*, agente responsável pela febre quartã, com acessos a cada 72 horas (BRUCE-CHWATT, 1985).

O ciclo de vida do *Plasmodium* inicia-se quando uma fêmea de mosquito do gênero *Anopheles* ingere sangue de um hospedeiro humano contendo formas sexuadas maduras denominadas gametócitos femininos e masculinos. No estômago do mosquito o gametócito masculino sofre exflagelação originando gametas masculinos ou microgametas, e o gametócito feminino sofre maturação formando um gameta feminino ou macrogameta. O microgameta, então, fertiliza o macrogameta e a fusão destes dois forma o zigoto, que após tornar-se móvel é chamado oocineto. O oocineto fixa-se na parede do estômago, entre as células epiteliais, sendo denominado oocisto. Dentro do oocisto formam-se muitos esporozoítas, que são células alongadas e móveis, com um núcleo central, que, após a liberação na cavidade corpórea do mosquito, alcançam as glândulas salivares tornando-o infectivo. Quando o mosquito alimenta-se novamente de sangue, os esporozoítas são injetados na corrente circulatória. Após um máximo de 30 minutos, os esporozoítas entram

nos hepatócitos e sofrem processo de desenvolvimento conhecido como esquizogonia pré-eritrocítica para se tornarem esquizontes, que rompem a célula e liberam merozoítas na circulação. A maioria então invade as células vermelhas do sangue e transformam-se em trofozoítas jovens ou anéis. Quando começam a crescer e seu citoplasma torna-se mais irregular, são denominados trofozoítas maduros que, após o processo de divisão assexual, são chamados de esquizontes, contendo inúmeros merozoítas em seu interior. Após o término do processo de divisão o esquizonte rompe a hemácia e os merozoítas liberados na corrente circulatória invadem novas hemácias e fazem novo ciclo eritrocítico. Esta liberação de parasitas na circulação é responsável pelo aparecimento dos sintomas e portanto, a duração do ciclo eritrocítico determina a periodicidade destes sintomas, variando entre as espécies de *Plasmodium*. Após algumas gerações de merozoítas, alguns se diferenciam em formas sexuadas (gametócitos), sofrem maturação e são ingeridos por fêmeas de anofelinos durante o repasto sanguíneo, fechando o ciclo. É importante ressaltar, que todos os estágios de parasitas durante a fase sanguínea são haplóides.

A malária causada por *P. vivax*, como também no caso de *P. ovale*, *P. cynomolgi*, *P. fieldi* e *P. simiovale*, difere notavelmente da malária causada por outras espécies de *Plasmodium*, por apresentar hipnozoítas. Os hipnozoítas são formas uninucleadas que se mantêm em estágio dormente no fígado após a entrada do esporozoíta no hepatócito, e que, decorrido um espaço de tempo variável, são ativadas, por mecanismos ainda desconhecidos, e causam novo ataque malárico denominado recaída (KROTOSKI et al., 1982a).

1.3. Recaídas

1.3.1. Definição

As recaídas foram definidas em 1948 como “o aparecimento e notável aumento de parasitemia após um período de latência” (COATNEY et al., 1948). Já em 1963, o Comitê da Organização Mundial da Saúde as definiu como “recorrência de manifestações de infecção devido a reinfeção de eritrócitos por formas exoeritrocíticas” (WHO, 1963 apud COATNEY, 1976). Treze anos depois as recaídas foram definidas precisamente como “o reaparecimento de parasitemia em uma infecção induzida por esporozoíta, após terapia esquizonticida sanguínea adequada” (COATNEY, 1976). Mais recentemente, utilizando as definições anteriores, foi formulada uma definição mais simples e atualmente utilizada: "reaparecimento das manifestações (sintomas clínicos, parasitemia ou ambos) de uma infecção palúdica, após um tempo superior ao da periodicidade normal dos acessos" (BRUCE-CHWATT, 1982).

Neste trabalho preferimos utilizar a definição de 1976, pois esta considera a forma de infecção e o tratamento dos estágios sanguíneos.

As recaídas podem ser clínicas ou parasitológicas; estas últimas manifestam-se exclusivamente pelo reaparecimento da parasitemia. Podem ser classificadas como precoces, ocorrendo antes de 2 meses após o ataque primário, ou tardias, ocorrendo após 6 meses do ataque primário, sendo o ataque primário definido como o ataque malárico que marca o fim do período de incubação. O termo recaída deve ser reservado para as novas manifestações de uma infecção provocada pelas formas exoeritrocíticas do parasita (BRUCE-CHWATT, 1982).

1.3.2. História das Recaídas

Provavelmente a primeira descrição de uma recaída clínica ocorreu no século passado, relatando três ataques de febre 21 meses após o ataque inicial, estando o indivíduo afastado de qualquer país com transmissão de malária por 2 anos (THAYER, 1897 apud KROTOSKI, 1985). Quatro anos depois, foi observada uma recaída em um adulto experimentalmente infectado, 9 meses após o ataque inicial (MANSON, 1901 apud KROTOSKI, 1985).

Apesar de já descritas, as recaídas permaneciam com sua origem desconhecida. Um grande passo deu-se ainda no início do século, quando Grassi sugeriu a existência de uma terceira fase no ciclo de vida dos parasitas da malária (BRUCE-CHWATT, 1985), visto que só se conhecia o ciclo no mosquito e o ciclo eritrocítico no homem.

Lamentavelmente, um ano depois, em uma descrição da biologia dos parasitas da malária, foi anunciada por Shaudinn, incorretamente, a entrada do esporozoíta diretamente no glóbulo vermelho e portanto, aparentemente, contrariando a teoria da terceira fase (BRUCE-CHWATT, 1985). Isto retardou esta linha de pesquisa por muitos anos, tanto que nos próximos 43 anos surgiram três teorias em relação à origem das recaídas que se baseavam neste conceito. A primeira supunha a existência contínua de um baixo grau de parasitemia eritrocítica regulada por mecanismos imunes do hospedeiro; a segunda sugeria um estágio eritrocítico dormente e a terceira propunha um desenvolvimento partenogenético atrasado do gametócito feminino após o clareamento das formas assexuadas eritrocíticas (KROTOSKI, 1985).

Posteriormente, novo passo foi dado em direção à descoberta acerca da origem das recaídas, quando foi proposto que as mesmas formas que causavam o ataque primário, ao sofrerem maturação atrasada causavam as recaídas (SHUTE, 1946). Estas formas foram chamadas de “corpos x”.

Finalmente foram descobertos esquizontes exo-eritrocíticos de *P. cynomolgi* no fígado de macacos (SHORTT & GARNHAM, 1948) e, no mesmo ano, as formas pré-eritrocíticas de *P. vivax* (SHORTT et al., 1948), confirmando a existência da terceira fase do ciclo e contribuindo notavelmente para a construção do ciclo de vida dos parasitas da malária.

Em vista da importante descoberta, foi formulada a teoria também chamada de hipótese do esquizonte sequencial (SHORTT & GARNHAM, 1948). Nesta teoria, o esporozoíta, após entrada no hepatócito, sofreria esquizogonia exoeritrocítica, formando o esquizonte hepático. Após a ruptura do esquizonte, merozoítas seriam liberados e cairiam na corrente circulatória e iniciariam o ciclo eritrocítico ou reinvasariam os hepatócitos sofrendo nova esquizogonia exoeritrocítica. Portanto, haveria a liberação contínua de merozoítas na circulação periférica e a diminuição dos mecanismos imunes do hospedeiro conduziria ao aparecimento dos sintomas e ao surgimento da recaída.

No ano seguinte, foi descrito o *P. vivax hibernans*, caracterizado por um longo período de incubação (NIKOLAIEV, 1949 apud BRUCE-CHWATT, 1985).

Entretanto, desde a sua divulgação, diversos autores publicaram objeções à teoria do esquizonte sequencial. Algumas questões foram resumidas (COATNEY et al., 1971 apud KROTOSKI, 1985):

a) se os merozoítas supostamente com tropismo para tecidos são transportados a novos hepatócitos via corrente circulatória, por quê as drogas efetivas contra os estágios assexuados sanguíneos não são capazes de evitar as recaídas?

b) se a diminuição da imunidade do hospedeiro é responsável pela ocorrência da recaída, como pode a imunidade cair com constante reexposição do sistema a uma contínua liberação de merozoítas?

c) se há contínua maturação de esquizontes exoeritrocíticos no curso da infecção, como explicar ataques primários “naturalmente” atrasados (por exemplo *P. vivax hibernans*), ou atrasados por drogas?

d) por quê estes “ninhos” de esquizontes teciduais constantemente amadurecendo nunca aparecem em preparações patológicas?

Em decorrência de tantas questões o próprio Garnham sugeriu então que fosse reintroduzida a teoria de Shute de 1946 (KROTOSKI, 1985).

Para explicar os diferentes padrões de recaídas, foi sugerida a existência de dois tipos de esporozoítas, onde os taquiesporozoítas sofreriam esquizogonia rápida, causando ataques primários precoces e os bradiesporozoítas sofreriam esquizogonia demorada, causando ataques primários tardios (MOSHKOVSKY, 1973 apud COATNEY, 1976).

De especial interesse para este trabalho, foram os experimentos envolvendo *P. cynomolgi* utilizando irradiação (WARREN & GARNHAM, 1970; WARREN et al., 1974) ou diluição (CONTACOS & COLLINS, 1973), onde a diminuição do número de recaídas produzidas, suportava o conceito de que as recaídas seriam derivadas de esporozoítas individuais.

Somente 30 anos após a utilização do termo “corpos x”, foi sugerido o nome “dormozoíta” para as formas dormentes responsáveis pela latência no subfilo Apicomplexa em geral (MARKUS, 1976), mas, no ano seguinte, foi proposta correção do termo para “hipnozoíta” (GARNHAM, 1977).

No momento em que foram re-examinadas todas as informações disponíveis acerca das recaídas, concluiu-se que somente os

taquiesporozoítas e bradiesporozoítas não eram suficientes para explicar os diferentes padrões de recaídas em *P. vivax* que seriam, então, causados pelo polimorfismo de esporozoítas (LYSENKO et al., 1977).

Finalmente, quando foram observados hipnozoítas de *P. cynomolgi* (KROTOSKI et al., 1982a) e *P. vivax* (KROTOSKI et al., 1982b) no fígado de macacos, foi formulada a teoria atualmente aceita em relação à origem das recaídas. Nesta teoria, os hipnozoítas, que são as verdadeiras formas latentes formadas após a entrada do esporozoíta no hepatócito, causam as recaídas através da esquizogonia exoeritrocítica que desenvolvem após sua ativação, liberando merozoítas para o ciclo eritrocítico. Infelizmente, os mecanismos pelos quais essas formas latentes são ativadas ainda permanecem obscuros.

A nível molecular ainda pouco se sabe sobre as recaídas de *P. vivax*. O único trabalho publicado até o momento compara o ataque primário com a recaída em seis pacientes (CRAIG & KAIN, 1996). Estes indivíduos eram turistas canadenses e viajaram para diferentes áreas endêmicas de malária, tais como América do Sul, sudeste da Ásia, oeste da África, Nova Guiné e Índia. Os autores utilizaram dois marcadores genéticos. Um segmento do gene MSP-1, que também será utilizado neste trabalho, e uma região do gene CSP, foram amplificados pela reação de polimerização em cadeia (PCR). Os fragmentos amplificados foram analisados por polimorfismo de conformação de simples fita (SSCP) ou por sequenciamento direto a fim de comparar as sequências de nucleotídeos obtidas no momento do ataque primário e no momento da recaída. Os autores concluíram que os parasitas provenientes das recaídas originam-se da mesma população de parasitas que circulam durante o ataque primário e que, portanto, as recaídas não são causadas por subpopulações geneticamente distintas.

1.3.3. Frequência das Recaídas

Muitos autores vêm publicando dados em relação à frequência das recaídas, utilizando pacientes de diferentes regiões endêmicas, o que torna os dados epidemiológicos muito divergentes.

Na Índia foi encontrado um índice de 6,9% de recaídas, estudando pacientes com *P. vivax* (SINHA et al., 1989). No ano seguinte, utilizando também pacientes da Índia, foi obtido um número bem menor, 2,6% (SHARMA et al., 1990), utilizando o mesmo esquema de tratamento.

No Brasil foi analisada a frequência de recaídas de malária por *P. vivax* diagnosticada em região não endêmica, Estado de São Paulo, Brasil (BOULOS et al., 1991). Foram estudados 4389 pacientes, atendidos na Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de 1981 a 1988. Destes, 1347 foram acompanhados por 6 meses e não referiram deslocamentos por áreas com transmissão de malária. Todos receberam o tratamento preconizado para *P. vivax*, que inclui a administração de primaquina por 14 dias, sem apresentar intercorrências. Os autores observaram um índice de 24,5% de recaídas, sendo que 51,2% ocorreram até 3 meses, 43,9% de 3 a 6 meses e 4,8% com mais de 6 meses após o tratamento.

Mais recentemente, foi obtido um índice de recaídas de 17,5% estudando-se pacientes da Tailândia (BUNNAG et al., 1994). Interessantemente, quando a dose de primaquina foi elevada de 15 mg/dia para 22,5 mg/dia por 14 dias, o índice de recaídas caiu para 2,4%. Todas as recaídas ocorreram dentro do período de 6 meses.

1.4. Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (MSP1)

A Proteína de Superfície do Merozoíta 1 (MSP1) dos parasitas da malária humana foi primeiro descrita para o *P. falciparum* (HOLDER & FREEMAN, 1982) e vem sendo muito estudada em decorrência da busca de um alvo para a produção de uma vacina contra a malária (HOLDER & RILEY, 1996). A MSP1 é uma glicoproteína de alto peso molecular (180-230 kDa) sintetizada como um precursor durante a esquizogonia, processada entre as principais proteínas de superfície do merozoíta e com função ainda pouco esclarecida, provavelmente relacionada ao processo de invasão do eritrócito (HOLDER & BLACKMAN, 1994).

O gene que codifica esta proteína apresenta-se em cópia única e, após ser isolado de *P. vivax* e clonado, verificou-se que codifica um peptídeo de 1726 aminoácidos (DEL PORTILLO et al., 1991). Quando esta sequência de aminoácidos foi comparada às sequências de aminoácidos deduzidas das sequências do gene da MSP1 de *P. falciparum* e *P. yoelii*, foram observadas 10 regiões de alta similaridade, chamadas de blocos conservados entre espécies (ICBs) e flanqueadas por regiões polimórficas.

Devido à impossibilidade de obtenção de antígenos de *P. vivax* em cultivo contínuo, marcadores genéticos facilmente amplificados por PCR precisam ser utilizados em estudos moleculares. O segmento polimórfico 5 (P5), flanqueado por ICB5 e ICB6 (Figura 1), do gene PvMSP-1 é um sólido marcador genético que vem sendo utilizado em muitos estudos (PORTO et al. 1992, DEL PORTILLO et al. 1993, PREMAWANSA et al. 1993, CHENG et al. 1993, MANCILLA et al. 1994; CRAIG & KAIN, 1996; KOLAKOVICH et al., 1996; PUTAPORNTIP et al., 1997). Este segmento é polimórfico entre diferentes espécies de *Plasmodium* e entre os únicos dois alelos completamente caracterizados da PvMSP-1, Belém (Tipo 1) (DEL PORTILLO et al., 1991) e Salvador (Tipo 2) (GIBSON et al., 1992). Além disso, este

segmento é um bom marcador genético da fase assexual sanguínea em estudos de *P. vivax* pois:

a) foi amplificado por PCR em todos os isolados testados do Brasil (PORTO et al., 1992 e DEL PORTILLO et al., 1993), Sri Lanka (PREMAWANSA et al., 1993), Colômbia (MANCILLA et al., 1994), Índia (CRAIG & KAIN, 1996), Papua Nova Guiné (KOLAKOVICH et al., 1996) e Tailândia (PUTAPORNTIP et al., 1997);

b) este segmento codifica uma sequência repetitiva de glutamina, o que facilita eventos de recombinação intragênica (PREMAWANSA et al., 1993);

c) estas sequências de aminoácidos estão expostas na superfície de esquizontes maduros (MANCILLA et al., 1994);

d) sua imunogenicidade foi demonstrada por ELISA, utilizando proteínas recombinantes e soro de paciente primo-infectado, e confirmada por IFA, após a purificação dos anticorpos específicos deste paciente (MANCILLA et al., 1994).

FIGURA 1. Representação da PvMSP1 (del Portillo et al., 1991). A região denominada como P5 representa o segmento polimórfico (Porto et al., 1992). Os oligonucleotídeos K2A e K2B são mostrados.

2. OBJETIVOS

A maioria dos casos de malária ocorridos no Brasil provêm da Região Amazônica, onde é difícil o acompanhamento prolongado e a diferenciação entre recaídas e reinfeções. Portanto, esta investigação visa um melhor conhecimento acerca das recaídas causadas por *P. vivax*, já que contamos com certa casuística e possibilidade de acompanhamento em Serviço sediado fora de área de transmissão ativa.

2.1. Objetivo Geral

- Caracterizar molecularmente as recaídas causadas por hipnozoítos de *P. vivax* utilizando um segmento polimórfico do gene MSP1 como marcador genético.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a nível molecular, utilizando técnicas de PCR, Southern blot, clonagem e sequenciamento, a forma alélica do gene da PvMSP1 presente nos estágios assexuados sanguíneos provenientes do ataque primário e dos hipnozoítos de um mesmo paciente.

- Determinar por ELISA, utilizando proteínas de fusão que expressam as formas alélicas Tipo 1 e 2 da PvMSP1, a resposta IgG específica presente no primeiro episódio malárico e na recaída de cada paciente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes

3.1.1. Amostras

Neste estudo foram utilizadas 20 amostras de sangue infectado por *P. vivax* provenientes do ataque primário e da recaída de 10 pacientes diagnosticados no Laboratório de Malária da SUCEN. Foram incluídos somente os pacientes que afirmaram ter permanecido fora de áreas com risco de transmissão de malária após o ataque primário e ter feito uso correto da medicação, sem apresentar intercorrências.

O sangue foi colhido por punção venosa em tubo seco, logo após a realização do diagnóstico. Uma alíquota de 300 µl foi imediatamente dispensada em tubo cônico de 1,5 ml e estocada a -20°C para posterior extração do DNA genômico. O sangue restante foi mantido a 37°C para formação do coágulo e posterior coleta do soro, o qual foi, em seguida, aliquotado e estocado a -20°C até o momento de sua utilização.

3.1.2. Medicação Utilizada

A cloroquina é uma 4-aminoquinoleína de rápida ação esquizotóxica sanguínea que tem efeito também nos estágios sexuais de *Plasmodium*, à exceção de *P. falciparum*. Neste estudo, todos os pacientes, após o diagnóstico inicial, foram tratados com 1500 mg de difosfato de cloroquina (CEME - Central de Medicamentos, Ministério da Saúde, Brasil), sendo 600 mg no dia 0, 450 mg no dia 1 (24 horas após o início do tratamento) e 450 mg no dia 2 (48 horas após o início do tratamento), considerando-se como dia 0 o dia do diagnóstico (SÃO PAULO, 1987).

Para eliminação dos estágios exoeritrocíticos, o tratamento é realizado com primaquina na forma de fosfato ou difosfato. A primaquina é uma 8-aminoquinoleína que substituiu a pamaquina por ser menos tóxica. Neste estudo, todos os pacientes receberam tratamento com fosfato de primaquina (15 mg ao dia durante 14 dias), iniciado no dia 0 (SÃO PAULO, 1987). No 15º dia do início do tratamento, todos os pacientes apresentaram diagnóstico negativo.

No momento da recaída, o tratamento foi repetido com 1500 mg de difosfato de cloroquina e 15 mg de fosfato de primaquina durante 14 dias como descrito anteriormente (SÃO PAULO, 1987).

No período de 1994 a 1995 foram utilizados pelo Laboratório de Malária da SUCEN, três diferentes lotes de fosfato de primaquina: o lote 9211007 (CEME), com validade até 11/95, utilizado de janeiro a agosto de 1994; o lote 9308003 (CEME), com validade até 08/96, utilizado de setembro de 1994 a fevereiro de 1995; e o lote 1112/G (Chanelle Medical Limited, Loughrea, Co., Galway, Ireland), com validade até 07/97, utilizado no restante do período.

3.2. Extração do DNA Genômico

Todas as soluções utilizadas estão descritas no Anexo I.

A extração do DNA genômico foi realizada essencialmente como descrito (DEL PORTILLO et al., 1993). A amostra de sangue foi lavada com 1 ml de TE por centrifugação a 12500 x g por 10 segundos a temperatura ambiente até a completa remoção da hemoglobina. O precipitado foi ressuspenso em 50 µl de tampão PK e incubado por 45 minutos a 65°C. Para a inativação da proteinase K, a amostra foi incubada a 95°C por 15 minutos e, em seguida, estocada a 4°C.

3.3. Amplificação de DNA

O segmento polimórfico (P5) do gene da PvMSP-1 foi amplificado por PCR, como descrito (PORTO et al., 1992). Uma alíquota de 10 µl de DNA genômico foi utilizada nas reações de PCR com 10 µl dos oligonucleotídeos K2A (5' gaattcACTACTTGATGGTCCTC 3') e K2B (5' gaattcTTGTGACATGCGTAAGCGG 3') na concentração de 10 µM. As reações foram realizadas com o Kit Gene Amp (Perkin Elmer Cetus) conforme instruções do fabricante, nas seguintes condições: 94°C/1min, 42°C/1min, 72°C/2min por 30 ciclos e mais um ciclo de extensão a 72°C por 10 min. Como controle positivo de amplificação foi utilizado o clone Tipo 1 (DEL PORTILLO et al., 1991) e DNA genômico humano foi utilizado como controle negativo.

3.4. Gel de Agarose e Southern Blot

Uma alíquota de 10 µl dos produtos amplificados foi analisada por eletroforese em gel de agarose tipo II a 1,5% (SIGMA) e tampão TBE na presença de brometo de etídeo (SAMBROOK et al., 1989). O gel foi fotografado e transferido para uma membrana de nitrocelulose, segundo técnica descrita (SOUTHERN et al., 1975). Brevemente, o DNA foi quebrado em UV Stratalinker 2400 (Stratagene), denaturado por 35 minutos sob leve agitação em solução de denaturação e transferido por 16 horas à membrana Hybond N plus (Amersham) nesta mesma solução. A membrana foi lavada em 2 x SSC por 5 minutos, seca a temperatura ambiente sobre papel de filtro e fixada em UV Stratalinker 2400 (Stratagene). A membrana foi novamente lavada em 2 x SSC e pré-hibridizada em solução de pré-hibridização I por 2 horas a 37°C em forno PersonalHyb (Stratagene). A membrana foi

hibridizada por 16 horas a 37°C, com a sonda radioativa (fragmento PCR K2A/K2B Tipo 1). As lavagens da membrana foram realizadas em 2 x SSC a temperatura ambiente por 20 minutos e em 0,2 x SSC/0.1% SDS a 50°C por 3 vezes de 15 minutos. Para a autoradiografia, foram utilizados Kodak Diagnostic Film X-OMAT-AR XK-1, Revelador e Reforçador GBX e Fixador e Reforçador GBX (Kodak). A membrana foi exposta a -70°C por 2 dias, para certificar que fossem detectados outros fragmentos não visíveis por brometo de etídio.

3.5. Preparo de Sondas Radioativas

A marcação de fragmentos de PCR foi realizada por “random primer” com o kit RPN 1601 (Amersham), conforme instruções do fabricante.

A marcação de oligonucleotídeos foi realizada com T4 polinucleotídeo quinase (PNK)(New England, Biolabs). Uma alíquota de 10 µl dos oligonucleotídeos K2A ou K2B na concentração de 10 µM, foi marcada com 2 µl de [γ ³²P] ATP, 2 µl do tampão da enzima 10x e 0,5 µl PNK, em volume final de 20 µl, por 2 horas a 37°C. A amostra foi precipitada com 60 µl de 10 mM EDTA pH 8.0, 40 µl de DNA transportador e 360 µl de etanol/acetato de amônio por 1 hora a -20°C. A amostra foi centrifugada a 12000 x g por 6 minutos a temperatura ambiente e ressuspendida em 100 µl de água.

3.6. Clonagem de DNA

3.6.1. Digestão do Fragmento de PCR com Enzima de Restrição

Após amplificação por PCR, os fragmentos obtidos foram limpos com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio e precipitados por 16 horas a -20°C com

2 volumes de etanol absoluto. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a 37°C por 5 minutos e ressuspendido em 80 µl de TE. Uma alíquota de 20 µl foi digerida com 5 U de Eco RI (Gibco) utilizando-se 5 µl de tampão React 3 (Gibco) em volume final de 50 µl, por 1 hora a 37°C. Os fragmentos digeridos foram limpos com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio, precipitados por 16 horas a -20°C com 2 volumes de etanol absoluto mais 10% do volume de 3 M de acetato de sódio pH 5.2, lavados com etanol 70% e ressuspendidos em 20 µl de TE.

3.6.2. Purificação de DNA do Gel de Agarose

Os fragmentos de PCR digeridos foram purificados para a clonagem, utilizando kit QIAEX II (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. O kit QIAEX II dispensa a extração com fenol e a precipitação com etanol e se baseia na utilização de partículas de sílica às quais o DNA é aderido. Todas as impurezas tais como agarose, proteínas, sais e brometo de etídio são removidas durante os passos de lavagem e o DNA puro é eluído eficientemente com TE.

3.6.3. Ligação do Fragmento Digerido ao Vetor

Uma alíquota de 9 µl do DNA digerido foi utilizada para ligação no vetor pBluescript SK+ (Stratagene) ou pUC18 (Promega) digeridos com Eco RI e defosforilados. A ligação foi realizada com diversas diluições do inserto, 50 ng de vetor, 1 µl de tampão T4 DNA ligase (USB) e 1 µl da enzima ligase (USB) durante 16 horas a 15°C. Uma ligação controle foi realizada nas mesmas condições, sem adição de inserto, para verificar a quantidade de religação do vetor defosforilado.

3.6.4. Preparo e Transformação de Células Competentes

Para o preparo das células competentes, 1 ml de uma cultura saturada de *Escherichia coli* (cepa XL1Blue) foi inoculado em 100 ml de SOB. As células foram crescidas a 37°C sob agitação constante, até uma DO₆₀₀ de 0,6 e, em seguida, foram mantidas em gelo por 15 minutos. As células foram centrifugadas a 1000 x g a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 35 ml de FSB e deixado em gelo por 15 minutos. Após nova centrifugação, como descrito acima, as células foram ressuspensionadas em 8 ml de FSB. DMSO foi adicionado a uma concentração final de 3,5% (v/v) e as células foram mantidas em gelo por 5 minutos. Igual alíquota de DMSO foi adicionada e as células foram mantidas em gelo por mais 15 minutos, sendo depois aliquoteadas e estocadas em nitrogênio líquido.

Células competentes (*E. coli* cepa XL1Blue) foram transformadas com plasmídeos recombinantes conforme descrito (SAMBROOK et al., 1989). As células competentes foram incubadas em gelo por 30 minutos juntamente com uma alíquota de plasmídeo recombinante. Após choque térmico as células foram mantidas brevemente em gelo e ressuspensionadas em meio SOC para recuperação. Para seleção dos transformantes, as células foram plaqueadas em placas LB-ágar-amp-tet. e incubadas a 37°C por 16 horas.

As placas com número de colônias significativamente maior que a placa controle (sem inserto), foram selecionadas para a triagem dos clones.

3.6.5. Métodos de Detecção de Clones Recombinantes

3.6.5.1. Extração de DNA Plasmidial e Digestão com Enzima de Restrição

As colônias transformantes foram crescidas por 16 horas a 37°C em LB-amp-tet, para extração do DNA plasmidial. A cultura de bactérias saturada foi centrifugada por 2 minutos a 10000 x g a temperatura ambiente. Ao precipitado de bactérias foram adicionados sucessivamente 300 µl de Solução 1 e 300 µl da Solução 2. O lisado bacteriano foi mantido por 5 minutos a temperatura ambiente, sendo adicionados em seguida 300 µl da Solução 3. A extração foi então mantida em gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12500 x g a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi recuperado. Ao sobrenadante foram acrescentados 600 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e a amostra foi centrifugada 2 minutos a 12000 x g a temperatura ambiente. A fase aquosa foi recuperada e o DNA foi precipitado com adição de 600 µl de isopropanol por 30 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 50 µl de TE.

Uma alíquota de 3 µl de cada extração foi digerida por uma hora a 37°C com 2 U de Eco RI (Gibco) utilizando 1,5 µl de tampão React 3 (Gibco) em um volume final de 15 µl. Como controle positivo da digestão, um clone Tipo 1 e um clone Tipo 2 foram utilizados. O volume total da digestão foi analisado em gel de agarose tipo II a 1% em tampão TBE, na presença de brometo de etídio. Os plasmídeos que continham inserto do tamanho previsto foram selecionados para o sequenciamento.

3.6.5.2. Hibridização

Esse método foi utilizado quando o número de colônias das placas foi superior a 20. Os filtros de nylon contendo réplicas das colônias (Hybond N plus, Amersham) foram denaturados por 3 minutos com solução de denaturação, neutralizados por 2 vezes de 3 minutos com solução de neutralização para filtros e lavados em 5 x SSC por 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação. O DNA foi fixado nos filtros em UV Stratalinker 2400 (Stratagene) e os filtros foram secos. Os filtros foram molhados em 5 x SSC e pré-hibridizados com a solução de pré-hibridização II por 2 horas a 37°C em forno PersonalHyb (Stratagene). A hibridização foi realizada por 16 horas com a sonda K2A ou K2B. Os filtros foram lavados em 6 x SSC com 0,5% SDS por 15 minutos a 37°C sob agitação e depois por mais 10 minutos na mesma solução a 55°C para K2A ou a 60°C para K2B.

3.7. Sequenciamento de DNA

3.7.1. Preparo da Amostra para Sequenciamento

O DNA plasmidial obtido em 3.6.5.1. foi denaturado com 2 N NaOH/ 2 mM EDTA por 15 minutos a 37°C e precipitado por 2 horas a -20°C com adição de 10 µl de acetato de amônio 2 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após precipitação, o DNA foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 10 µl de TE. Uma alíquota de 1 µl foi utilizada para dosagem de DNA no aparelho GeneQuant (Pharmacia) e 1,5-2,0 µg de DNA foram utilizados para cada reação de sequenciamento.

3.7.2. Reação de Sequenciamento

Os clones recombinantes obtidos foram sequenciados pelo método de Sanger dideoxy (SANGER et al., 1977) com o Kit T7 Sequencing™ (Pharmacia Biotech) conforme instruções do fabricante. O radioativo utilizado foi [α 35 S]dATP (Amersham).

Os oligonucleotídeos utilizados foram Forward (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') e Reverse (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'), T3 (5' ATTAACCCTCACTAAAG 3') e T7 (5' TTAATACGACTCACTAT 3'), os quais reconhecem a sequência do vetor e os oligonucleotídeos K2A, K2B, Ng6 (5' ATGCGGTAACATCTG 3'), Ng7 (5' ATGCGCAAACAGCTG 3') e RT-4 (5' CAGCTGTTTGCGCAT 3'), que reconhecem sequências da região P5 do gene da PvMSP1. Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados pela empresa Oligos Etc. Inc.

3.7.3. Preparo do Gel de Sequenciamento

O gel foi preparado através da adição de 20 ml de solução de acrilamida 20%, 25 ml de solução de uréia 46,7% e 5 ml de TBE 10x. Esta mistura foi filtrada e deaerada por 5 minutos. Para a polimerização do gel, 100 μ l de persulfato de amônio a 25% foram adicionados juntamente com 50 μ l de TEMED.

3.7.4. Eletroforese e Autoradiografia

Para a eletroforese, utilizou-se uma alíquota de 2 μ l de cada reação de sequenciamento, após denaturação a 95°C por 2 minutos, que foi analisada em gel de sequenciamento a 40 W utilizando fonte de alta voltagem (Biorad). Após a corrida, o gel foi fixado por 10 minutos com ácido

acético a 5% e lavado por 5 minutos em água. O gel foi retirado da placa, coberto com filme plástico, seco a 80°C por 1 hora em secador de gel (Zabona AG, Basel) e exposto em filme X-OMAT AR (Kodak).

3.8. Teste Imunoenzimático (ELISA)

3.8.1. Preparo das Proteínas de Fusão

3.8.1.1. Preparo de Células Competentes

Células competentes *E. coli* (cepa DH5 α) foram preparadas como descrito no item 3.6.4.

3.8.1.2. Transformação de Células Competentes

Células competentes (*E. coli* cepa DH5 α) foram transformadas com plasmídeos recombinantes pGEX-2T e pGEX-3X/PvMSP1₁₉ conforme descrito no item 3.6.4. O plasmídeo recombinante pGEX-2T contém o bloco polimórfico P5 de Tipo 1 ou Tipo 2 da PvMSP-1 (MANCILLA et al., 1994) e o plasmídeo recombinante pGEX-3X/PvMSP1₁₉ contém parte do bloco polimórfico 9 (P9) mais o bloco conservado ICB10 da PvMSP-1 (SOARES et al., 1997). Para seleção dos transformantes, as células foram plaqueadas em placas LB-ágar-amp. e incubadas a 37°C por 16 horas.

3.8.1.3. Expressão e Purificação das Proteínas de Fusão

A expressão e purificação das proteínas de fusão foi realizada como descrito (LEVITUS et al., 1994). As bactérias recombinantes, foram

crecidas a 37°C até uma DO_{600} de 0,6 e induzidas por 3 horas com 0,1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG) para a expressão da proteína recombinante. As bactérias foram centrifugadas, ressuspendidas em 1/20 do volume inicial da cultura de PBS com 0.1% (v/v) de Triton X-100 e lisadas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Os extratos crus foram tratados com 5 μ g/ml de DNase I por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 5000 x g por 20 minutos a 4°C. Todas as proteínas de fusão foram purificadas a partir do sobrenadante da cultura. Para a purificação, as proteínas recombinantes foram adsorvidas à colunas de glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia) e eluídas em 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 120 mM NaCl, 20 mM glutathione reduzida. A pureza dos produtos foi determinada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e a concentração das proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.8.2. Padronização

A padronização do ELISA foi realizada para determinar as diluições de soro, proteínas de fusão e conjugados a serem utilizadas.

Foram utilizados 4 soros sendo um soro de indivíduo sem história de malária anterior e sem deslocamento por áreas com risco de transmissão de malária, dois soros (9P e 9R) que reagem com ambas as proteínas de fusão (Tipo 1 e Tipo 2) e um soro policlonal produzido em camundongo contra a GST. Todos os soros foram testados em quatro diluições (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) exceto o soro policlonal que foi utilizado nas diluições de 1:500, 1:1000 e 1:2000.

Para a padronização do antígeno, foram testadas três diferentes concentrações (100 ng, 200 ng e 300 ng por cavidade) das proteínas de fusão que expressam Tipo 1, Tipo 2, a região C-terminal da PvMSP1 e também da proteína GST isolada.

Para a padronização da diluição de conjugado a ser utilizada, os conjugados foram diluídos seriadamente e testados nas condições de soro e antígeno estabelecidas.

3.8.3. Descrição da Reação

A reação foi realizada essencialmente como descrito (LEVITUS et al., 1994). Os soros humanos coletados na primeira infecção e na recaída de cada paciente foram adicionados na diluição de 1:100, à placas sensibilizadas com 300 ng das proteínas de fusão Tipo 01, Tipo 02 ou a região C-terminal da PvMSP1, seguidos por anti IgG humana conjugada a peroxidase (Biosys, France), na diluição de 1:500. A reação foi revelada utilizando-se TMB como substrato (Kirkegaard & Perry, Gaithersburg), parada com 1 M H₃PO₄ e lida a DO₄₅₀. Todas as DOs representam a ligação de IgG à proteína recombinante após subtração da DO obtida na ligação do mesmo soro à GST sozinha. Cada soro foi testado duas vezes em ensaios independentes. Foram utilizados como controles normais soros de 12 indivíduos sem história prévia de malária. Foram considerados positivos os soros com DO maior que a média dos controles normais acrescidos de 3 DPs.

3.8.4. Determinação dos Títulos Contra P5 e a Região C-terminal

Para a determinação dos títulos, os soros foram testados, como descrito no item 3.8.3., em diluições seriadas de 1:100 a 1:12800. Os soros de 5 indivíduos normais, sem história prévia de malária, foram utilizados para determinação do limiar de positividade.

3.8.5. Determinação das Subclasses de IgG Contra a Região C-terminal

Para a determinação das subclasses de IgG contra a região C-terminal da PvMSP1, após a incubação dos soros (diluídos 1:100) às placas sensibilizadas com 300 ng da proteína de fusão e GST, foram utilizados anticorpos de camundongo anti IgG₁, anti IgG₂, anti IgG₃ e anti IgG₄ humanas, na diluição de 1:500. As subclasses foram detectadas após a incubação com anti IgG de camundongo conjugada à peroxidase diluída 1:500. A reação foi seguida como descrito no item 3.8.3. Foram utilizados como controles normais soros de 12 indivíduos sem história prévia de malária.

3.8.6. Ensaios de Afinidade dos Anticorpos Contra a Região C-terminal

Os ensaios de afinidade foram realizados conforme descrito (FERREIRA & KATZIN, 1995). Após incubação com os soros, os anticorpos foram eluídos com NH₄SCN (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). O tiocianato de amônia foi diluído em PBS e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente em um volume de 100 µl por cavidade. As molaridades utilizadas foram: 5 M, 2,5 M, 1,25 M, 625 mM, 312,5 mM, 156,25 mM e 78,12 mM. Nas cavidades controle foi adicionado somente PBS. O ensaio foi seguido a partir da lavagem padrão como anteriormente descrito no item 3.8.3.

3.9. Análise Estatística

A análise dos dados quantitativos foi realizada com o uso do teste t para a diferença de média. Para verificação de associação entre a forma alélica detectada por PCR/Southern blot e a resposta IgG específica detectada por ELISA, foi realizado o coeficiente de kappa. Para comparação dos títulos de anticorpos observados contra P5 e a região C-terminal, foi utilizada média geométrica (BERQUO et al., 1981).

4. RESULTADOS

4.1. Amostras

No período de junho de 1994 a setembro de 1995, foram coletadas 20 amostras, referentes ao ataque primário e à recaída de 10 pacientes atendidos no Laboratório de Malária da SUCEN. Todos os pacientes são residentes no Estado de São Paulo e viajaram a estados brasileiros da região endêmica de malária (Mato Grosso, Rondônia e Pará) por motivos distintos. Todos os pacientes foram medicados corretamente no momento do ataque primário, não apresentaram intercorrências e permaneceram afastados de áreas com risco de transmissão de malária durante o período de acompanhamento. Estes pacientes, então, retornaram ao Laboratório de Malária, novamente com sintomas e diagnóstico positivo para *P. vivax*, o que foi classificado epidemiologicamente como recaída. Alguns pacientes já haviam tido malária anteriormente, no mínimo há 1 mês, inclusive com diagnóstico de *P. vivax*. Os dados epidemiológicos dos 10 pacientes são sumarizados na Tabela I.

Tabela I: Pacientes utilizados no estudo.

PACIENTE NÚMERO	ATAQUE PRIMÁRIO (P)	RECAÍDA (R)	REGIÃO AMAZÔNICA	PRIMO INFECTADO
1	01.06.94	06.07.94	MT	SIM
2	01.08.94	21.10.94	PA	SIM
3	09.08.94	07.12.94	RO	NÃO (<i>P. vivax</i> há 1 mês)
4	31.10.94	17.01.95	MT	SIM
5	30.11.94	16.03.95	MT	NÃO (<i>P. vivax</i> há 1 mês)
6	04.10.94	07.04.95	RO	NÃO (<i>P. vivax</i> há 1 mês)
7	23.02.95	16.05.95	PA	?
8	16.06.95	14.08.95	RO	SIM
9	26.06.95	25.08.95	MT	NÃO (<i>P. vivax</i> há 3 meses)
10	30.06.95	04.09.95	RO	SIM

MT= Mato Grosso

PA= Pará

RO= Rondônia

4.2. Amplificação de DNA e Southern Blot

Trabalhos anteriores, realizados com isolados de diferentes regiões geográficas, utilizaram um segmento polimórfico do gene da Proteína de Superfície do Merozoíta 1 de *P. vivax* (PvMSP1) como marcador genético (DEL PORTILLO et al., 1991; GIBSON et al., 1992; PORTO et al., 1992; DEL PORTILLO et al., 1993, PREMAWANSA et al., 1993; MANCILLA et al., 1994). Duas formas alélicas principais (Tipo 1 e Tipo 2) e uma terceira forma alélica (Tipo 3), produto de recombinação intragênica, foram identificadas em infecções naturais. Então, a primeira parte deste trabalho foi realizada para verificar se estas mesmas formas alélicas estavam presentes nos ataques primários e nas recaídas de pacientes infectados em três diferentes estados da Amazônia Brasileira. Portanto, o segmento polimórfico 5 (P5) do gene que codifica a PvMSP1 foi amplificado por PCR de DNA genômico total de 20 amostras provenientes de 10 pacientes (Tabela I). Estes fragmentos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose na presença de brometo de etídeo (Figura 2a e 2c), transferidos para membrana de nylon Hybond N plus e hibridizados com uma sonda específica (Figura 2b e 2d). A especificidade das bandas vistas no gel de agarose com brometo de etídeo foi confirmada após a realização do Southern blot. Dois fragmentos diferentes em tamanho, com mais ou menos 0.5 kb, foram especificamente amplificados em todas as amostras, confirmando o diagnóstico hemoscópico. Os resultados mostram que, no ataque primário, quatro amostras apresentaram os dois alelos, duas apresentaram a forma alélica do Tipo 1 e quatro a forma alélica do Tipo 2. O paciente 10 revelou, na recaída, a presença de parasitas com a forma alélica Tipo 1 não detectada no ataque primário. Notavelmente, na recaída, das quatro amostras que haviam amplificado as duas formas alélicas no ataque primário (pacientes 2, 3, 8 e 9), duas (pacientes 8 e 9) apresentaram

FIGURA 2. Amplificação por PCR. **a e c)** Análise dos produtos de PCR em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. **b e d)** Determinação da especificidade dos fragmentos de PCR obtidos por Southern blot utilizando fragmento K2A/K2B como sonda. 1 (Tipo1), 2 (Tipo2), H (humano), M (marcador de peso molecular Lambda Drigest III). As amostras utilizadas correspondem às amostras da Tabela I. Peso molecular em kilopares de bases (kb).

novamente as duas formas alélicas, demonstrando, pela primeira vez, que a ativação de hipnozoítas não é clonal.

4.3. Clonagem e Sequenciamento de DNA

O tamanho dos fragmentos de PCR e a intensidade de hibridização obtidos no Southern blot (Figura 2) são indicadores da presença predominante das formas alélicas do Tipo 1 e 2, porém, com essa metodologia não é possível a distinção entre formas alélicas do Tipo 1 e 3, pois estas possuem o mesmo tamanho. Portanto, somente a clonagem e o sequenciamento do DNA destes fragmentos podem demonstrar a presença de novas formas alélicas e o grau de heterogeneidade das formas alélicas do Tipo 1 e 2. Então, os fragmentos de PCR de 12 amostras, obtidos no ataque primário e na recaída de 6 pacientes, foram clonados e sequenciados. A Figura 3 mostra, através de um esquema da comparação de sequências de aminoácidos, os resultados obtidos. Substituições, deleções e inserções de aminoácidos foram representadas como barras transversais. Em todos os pacientes, quando a mesma forma alélica foi detectada no ataque primário e na recaída, a sequência de aminoácidos encontrada foi idêntica nestes dois momentos.

A presença da forma alélica do Tipo 01 foi confirmada em 3 amostras. Uma pequena heterogeneidade foi revelada após o sequenciamento e comparação com a sequência publicada (DEL PORTILLO et al. 1991). As amostras 1P e 1R apresentaram 142 aminoácidos, devido a uma deleção na região de repetição de glutamina de 8 aminoácidos (aa de número 61 a 69 na sequência publicada). Dois aminoácidos (aa 47 e 60) substituídos, foram também detectados. Na amostra 9R foram encontrados também 142 aa, mas três substituições (aa 34, 47 e 61) foram observadas.

A forma alélica do Tipo 2 (GIBSON et al., 1992) foi a mais prevalente, sendo que foi encontrada em 5 dos 6 pacientes analisados. Em todos os

pacientes, exceto no paciente 10, a forma alélica Tipo 2 apresentou 172 aminoácidos. A sequência do paciente 6 apresentou 2 substituições (aa 66 e 120) e uma inserção (aa 68). O paciente 7 apresentou em sua sequência uma inserção (aa 67) e a mesma substituição do paciente 6 no aminoácido 120. Essas mesmas modificações foram encontradas na sequência da forma alélica de Tipo 2 presente no paciente 8, entretanto, uma nova substituição foi encontrada no aminoácido 143 na sequência deste paciente. No paciente 9 as modificações encontradas foram as mesmas existentes nos aminoácidos 66 e 68 da sequência do paciente 6. Finalmente, o paciente 10 apresentou, na sequência da forma alélica de Tipo 2, somente uma substituição no aminoácido 119 e, portanto, 171 aminoácidos como a sequência publicada (GIBSON et al., 1992).

Três pacientes apresentaram a forma alélica do Tipo 3, supostamente identificada como Tipo 1 por PCR e Southern blot (Figura 2). Todas as sequências foram semelhantes à sequência já descrita (PREMAWANSA et al., 1993). Estas sequências se caracterizam por serem produto de recombinação das duas outras, sendo que, neste caso, iniciam-se com a região anterior de Tipo 2, têm uma região de poliglutamina e terminam com a região posterior de Tipo 1. As sequências obtidas apresentaram 151 aminoácidos, pois 21 glutaminas foram observadas na região de repetição, diferentemente da sequência publicada que apresentou 19 glutaminas. Além disso, uma deleção no aminoácido 130 e uma substituição no aa 112, foram encontradas.

Como previsto, apesar das deleções, inserções e substituições encontradas, todas as sequências apresentaram fase de leitura aberta.

FIGURA 3. Esquema da comparação de seqüências de aminoácidos das formas alélicas descritas para o segmento polimórfico P5 da PvMSP1 mostrando 12 amostras referentes ao ataque primário (P) e a recaída (R) de 6 pacientes (Tabela I)

4.4. Teste Imunoenzimático (ELISA)

Resultados de estudo anterior demonstraram que o segmento polimórfico 5 (P5) era imunogênico em infecções naturais (MANCILLA et al., 1994) e indicaram uma correlação entre a forma alélica detectada por PCR/Southern blot e a resposta IgG específica. Portanto, a segunda parte deste trabalho foi a determinação, por teste imunoenzimático utilizando proteínas de fusão que expressam as formas alélicas do Tipo 1, Tipo 2 e a região C-terminal, da resposta IgG específica presente no momento do ataque primário e no momento da recaída de 7 pacientes descritos na Tabela I. Esta resposta foi estudada quanto ao título de anticorpos, subclasses de IgG envolvidas e padrões de afinidade.

4.4.1. Padronização

A padronização das condições do teste de ELISA foi realizada para determinar as melhores diluições de proteínas de fusão, soros e conjugados a serem utilizadas. Para estabelecer estas condições, foi escolhida uma proteína de fusão (Tipo1), a proteína GST e um soro (9P). Os resultados obtidos nas Figuras 4a e 4b, mostram as DOs obtidas em função das diluições do soro, para as diferentes concentrações da proteína de fusão e GST. Portanto, na diluição de soro de 1:100, a melhor concentração da proteína de fusão a ser utilizada foi de 300 ng por cavidade, visto que, nesta concentração, foi encontrada uma maior diferença de DO com a GST.

FIGURA 4. Padronização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA). **a)** diluição do antígeno. **b)** diluição do soro.

Através de diluição seriada do conjugado, utilizando as concentrações de proteína de fusão e soro estabelecidas, foi possível determinar a concentração ideal a ser utilizada que foi padronizada para 1:500 para imunoglobulina de cabra anti IgG humana, 1:500 para imunoglobulinas de camundongo anti subclasses humanas e 1:500 para imunoglobulina de cabra anti IgG de camundongo.

4.4.2. Determinação dos Títulos Contra P5 e a Região C-terminal

Estudo anterior demonstrou que não havia reação cruzada entre anticorpos específicos de pacientes contra as formas alélicas do Tipo 1 e 2 e proteínas de fusão que expressam essas formas alélicas (MANCILLA et al., 1994). Entretanto, é importante ressaltar, que há uma reação cruzada entre anticorpos que reconhecem especificamente as formas alélicas de Tipo 3 e as proteínas de fusão que expressam formas alélicas do Tipo 1 e 2. Portanto, para determinar a especificidade das respostas IgG dos pacientes descritos na Tabela I, placas de ELISA foram sensibilizadas com proteínas de fusão expressando as formas alélicas do Tipo 1 e 2 e testadas com os soros dos mesmos, coletados durante o ataque primário e durante a recaída. A Figura 5 mostra as DOs obtidas para 7 pacientes quando os soros foram testados com proteínas de fusão que expressam Tipo 1 (a) ou Tipo 2 (b). Os resultados demonstraram que, seja na primeira infecção ou na recaída, todos os pacientes possuíam anticorpos IgG específicos contra as formas alélicas Tipo 1, Tipo 2 ou ambas. Estes resultados foram concordantes com os resultados obtidos por Western blot (dados não apresentados). No momento da recaída, excluindo-se o paciente 6, houve um aumento significativo nas DOs obtidas ($p < 0,05$), confirmando que o reaparecimento de parasitas na corrente circulatória

funciona como novo estímulo à produção de anticorpos, inclusive soroconvertendo algumas amostras (Tabela II). Somente 2 pacientes (Pacientes 6 e 9) tiveram diminuição de títulos de anticorpos no momento da recaída, mas apenas o paciente 6 apresentou um decréscimo importante (Figura 5b), provavelmente porque foi o único paciente que sofreu uma recaída tardia (após 6 meses). Além disso, foi observada uma associação entre a forma alélica detectada por PCR/Southern blot e a resposta IgG específica determinada por ELISA ($p < 0,06$ para Tipo 1 e $p < 0,05$ para Tipo 2).

A região C-terminal da PvMSP-1 foi utilizada neste momento para uma comparação com P5 em relação aos títulos de anticorpos específicos, visto que tem se mostrado a mais imunogênica em infecções naturais de pacientes de Belém do Pará (SOARES et al., 1997). Os títulos de anticorpos IgG encontrados contra P5 foram bem mais baixos do que contra a região C-terminal (Figura 6)(média geométrica 65 para P5(P) e 429 para C(P); média geométrica 441 para P5(R) e 3315 para C(R)). Por este motivo, os próximos experimentos para determinação de subclasses de IgG e afinidade de anticorpos, foram realizados somente com a região C-terminal da PvMSP1.

FIGURA 5. Densidades ópticas (DO) obtidas em ELISA para anticorpos IgG contra proteínas de fusão que expressam P5 do Tipo 1 (a) ou Tipo 2 (b), em soros coletados de 7 pacientes (1-10, Tabela I) durante o ataque primário (●) e durante a recaída (?). Limiar de positividade: 280 (Tipo1) e 180 (Tipo2).

FIGURA 6. Títulos de IgG contra proteínas de fusão que expressam P5 e a região C-terminal da PvMSP1, obtidos por ELISA, em soros coletados durante o ataque primário (P) e durante a recaída (R) de 7 pacientes (1-10, Tabela I).

Tabela II. Forma alélica e títulos de anticorpos IgG detectados contra a região polimórfica 5 (P5) da PvMSP-1 em soros pareados coletados durante o ataque primário (P) e durante a recaída (R) em 7 pacientes (Tabela I) infectados na Amazônia Brasileira.

Pacientes	Southern blot	ELISA (títulos)	
		T1	T2
1P	T1	1:50	-
1R	T1	1:100	-
2P	T1/T2	-	1:50
2R	T2	1:200	1:3200
3P	T1/T2	-	1:400
3R	T2	1:100	1:800
4P	T2	-	-
4R	T2	-	1:50
6P	T2	-	1:1600
6R	T2	-	1:200
9P	T1*/T2	1:800	1:3200
9R	T1/T2	1:400	1:1600
10P	T2	-	-
10R	T1*	1:800	1:800

* (Formas alélicas posteriormente identificadas como Tipo 3 através de sequenciamento de DNA).

4.4.3. Determinação das Subclasses de IgG Contra a Região C-terminal

Profundas diferenças foram verificadas na distribuição de subclasses de IgG em indivíduos protegidos e não protegidos contra a malária falcípara (BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992). IgG₁ e IgG₃, dois isotipos citofílicos, predominaram em indivíduos protegidos, mas em indivíduos não protegidos diferentes situações foram encontradas, inclusive um predomínio de IgG₂, uma classe não-citofílica, principalmente nos indivíduos primo-infectados. Entretanto, a distribuição das subclasses de IgG em infecções naturais e em recaídas causadas por *P. vivax*, permanece desconhecida. Portanto, os anticorpos IgG específicos contra a região C-terminal da PvMSP1 foram testados por ELISA para determinar as subclasses de IgG presentes em soros coletados durante o ataque primário e durante a recaída de sete pacientes (1, 2, 3, 4, 6, 9, e 10, Tabela I). Estes dados, expressos em porcentagens de soros positivos para cada subclasse de IgG, são apresentados na Figura 7. Os resultados demonstraram um predomínio de anticorpos IgG₁, mas também foram encontrados anticorpos IgG₂ e IgG₄. Não foi encontrado nenhum padrão na distribuição das subclasses, apesar de na recaída ocorrer um aumento de soros positivos para IgG₁, diminuição para IgG₂ e ausência de soros positivos para IgG₄.

FIGURA 7. Subclasses de anticorpos IgG contra a região C-terminal da PvMSP1, presentes em soros pareados de 7 pacientes (Tabela I) coletados durante o ataque primário (P) e durante a recaída (R).

4.4.4. Ensaios de Afinidade dos Anticorpos Contra a Região C-terminal

Trabalho anterior realizado com soros pareados obtidos de pacientes em diferentes estágios de malária falcípara, demonstrou uma maturação na afinidade dos anticorpos IgG presentes na fase convalescente em relação à fase aguda (FERREIRA & KATZIN, 1995). Entretanto, nada se conhece a respeito da afinidade dos anticorpos presentes durante a malária vivax e a recaída decorrente desta infecção. Portanto, os anticorpos específicos contra a região C-terminal da PvMSP1 foram testados por ELISA quanto à sua afinidade no momento do ataque primário e no momento da recaída para 4 pacientes. Foram incluídos também nos ensaios, 4 pacientes que não sofreram recaída durante o período de acompanhamento, realizado por 6 meses. As barras dos histogramas mostrados nas Figuras 8, 9 e 10, representam a proporção de anticorpos eluídos nas cavidades incubadas com diferentes concentrações de tiocianato de amônio, em relação à cavidade controle (sem tiocianato de amônio). Conforme se aumenta a concentração do tiocianato de amônio, se eluem os anticorpos da subpopulação de maior afinidade. As Figuras 8a e 8b mostram os resultados obtidos com o paciente 1, que apresentou um importante decréscimo na fração de anticorpos de menor afinidade durante a recaída (b) em relação ao ataque primário (a). Os dados obtidos com o paciente 3, mostram uma modificação de curva unimodal presente no ataque primário (8c) para multimodal na recaída (8d), indicando, neste último momento, uma alta heterogeneidade nas subpopulações de anticorpos em relação à afinidade. Porém, uma notável maturação na afinidade foi também observada durante a recaída nos pacientes 6 e 10, através do deslocamento para a direita no histograma (Figura 9). Interessantemente, os resultados obtidos com pacientes que não recaíram demonstraram uma maior

afinidade dos anticorpos, visto que a maioria destes (70 a 87%) só é eluída pelo tiocianato de amônio nas maiores concentrações (2,5 e 5 M)(Figura 10).

FIGURA 8. Padrões representativos das distribuições de afinidade de anticorpos IgG contra a região C-terminal da PvMSP1 em soros pareados coletados durante o ataque primário (**a** e **c**) e durante a recaída (**b** e **d**) nos pacientes 1 e 3 da Tabela I.

FIGURA 9. Padrões representativos das distribuições de afinidade de anticorpos IgG contra a região C-terminal da PvMSP1 em soros pareados coletados durante o ataque primário (**a e c**) e durante a recaída (**b e d**) nos pacientes 6 e 10 da Tabela I.

FIGURA 10. Padrões representativos das distribuições de afinidade de anticorpos IgG contra a região C-terminal da PvMSP1 em soros coletados durante o ataque primário em 4 pacientes (**a**, **b**, **c** e **d**) que não apresentaram recaída durante o período de acompanhamento de 6 meses.

5. DISCUSSÃO

Plasmodium vivax apresenta hipnozoítas, formas que se mantêm em estágio dormente no fígado e que, após um período de tempo variável, por mecanismos ainda desconhecidos, causam novo ataque malárico denominado recaída (KROTOSKI et al., 1982). Para contribuir para um melhor conhecimento acerca bases moleculares das recaídas causadas por *P. vivax*, neste trabalho foram analisadas amostras pareadas referentes ao ataque primário e à recaída de pacientes que se infectaram na Amazônia Brasileira. Através da amplificação de um segmento polimórfico do gene da MSP1, foi encontrado um índice de 40% de infecções mistas, presentes inclusive durante a recaída, indicando que estes episódios não ocorrem a partir da ativação de um único hipnozoíta. Em análise mais detalhada deste segmento polimórfico, utilizando técnicas de clonagem e sequenciamento, foi possível verificar a presença das formas alélicas do Tipo 1, 2 e 3 (DEL PORTILLO et al., 1991; GIBSON et al., 1992 e PREMAWANSA et al, 1993). O estudo da resposta IgG específica contra o segmento polimórfico 5 e contra a região C-terminal da PvMSP1 demonstrou, durante a recaída, um aumento significativo nos títulos acompanhado por uma maturação na afinidade destes anticorpos.

Um importante aspecto em relação às recaídas surge, principalmente recentemente, em virtude do crescente número de publicações em muitas áreas geográficas (GASCON et al., 1994 e BUNNAG et al., 1994). Trata-se, possivelmente, da resistência do *P. vivax* à primaquina que, senão um problema atual devido à falta de evidências mais concretas, com certeza em um futuro bem próximo já não possa ser descartado (COLLINS & JEFFERY, 1996). O crescente aumento de casos causados por *P. vivax* no Brasil pode estar relacionado a esse fenômeno. Neste trabalho, foram utilizados 10 pacientes que, além de terem permanecido afastados de áreas com risco de transmissão de malária desde o ataque primário, foram medicados corretamente, inclusive com a administração de primaquina. Entretanto, após

um período variável de até 6 meses, como obtido também em outro trabalho (BOULOS et al., 1991), novamente apresentaram diagnóstico positivo para *P. vivax*. Estes resultados poderiam ser explicados ou por administração de tratamento incorreto, no que diz respeito às dosagens contidas nos comprimidos ou por surgimento de resistência à primaquina. Contudo, estes pacientes foram tratados com medicamentos de diferentes fabricantes e lotes, o que provavelmente excluiria a primeira possibilidade. Portanto, estudos específicos para determinar a susceptibilidade do *P. vivax* à primaquina devem ser iniciados imediatamente, pois se não houver resistência, um tratamento mais adequado deve ser preconizado pela Organização Mundial da Saúde; ou, se houver, as bases moleculares da resistência do *P. vivax* à primaquina devem ser pesquisadas com a maior brevidade possível.

Devido à impossibilidade de manutenção de *P. vivax* em cultivo contínuo, a caracterização molecular de recaídas foi iniciada só recentemente através de técnicas sensíveis tais como polimorfismo de conformação de simples fita (SSCP) e PCR (CRAIG & KAIN, 1996). Neste estudo, a análise por SSCP de fragmentos de PCR dos genes CSP e MSP1 de *P. vivax*, obtidos durante o ataque primário e durante a recaída de 6 pacientes, demonstrou padrões idênticos em um mesmo paciente. Entretanto, cada paciente apresentou um padrão individual. Estes resultados foram posteriormente confirmados por sequenciamento de DNA e mostraram que a microheterogeneidade detectada entre as amostras de diferentes pacientes foi resultante de substituições, deleções e/ou inserções e não de um extenso polimorfismo alélico. Portanto, somente três formas alélicas do gene PvMSP1 (DEL PORTILLO et al., 1991; GIBSON et al., 1992 e PREMAWANSA et al., 1993) foram detectadas (CRAIG & KAIN, 1996). Estes mesmos resultados foram obtidos em nosso estudo com amostras de 10 pacientes que se infectaram em diferentes regiões geográficas da Amazônia Brasileira, utilizando o mesmo segmento polimórfico do gene PvMSP1. Entretanto,

diferentemente do estudo reportado (CRAIG & KAIN, 1996), 40% de nossas amostras continham infecções mistas. A existência de tão alta porcentagem de infecções mistas deveria favorecer eventos de recombinação intragênica durante o ciclo que o parasita desenvolve no mosquito, os quais, por sua vez, deveriam gerar muitas outras formas alélicas da MSP1. Entretanto, somente as formas alélicas Tipo 1, 2 e 3, do gene MSP1 de *P. vivax* foram encontradas. Estes resultados podem ser explicados por três hipóteses: i) uma baixa frequência de eventos de recombinação intragênica do gene que codifica a PvMSP1; ii) apesar de desenvolver reprodução sexuada, o desenvolvimento dos parasitas da malária na natureza ocorre principalmente através de reprodução clonal (TIBAYRENC et al., 1990); iii) seleção positiva destas formas alélicas dentro do hospedeiro humano, devido à propriedades funcionais ou estruturais atualmente desconhecidas destas sequências. Recentemente, resultados obtidos com análise de isolados da Tailândia (PUTAPORNTIP et al., 1997) sugeriram a presença de duas novas formas alélicas. À medida que novos genes e alelos sejam caracterizados em populações naturais de *P. vivax*, estes estudos continuarão a ser aprofundados a fim de se encontrar o grau de polimorfismo alélico em populações de parasitas presentes no ataque primário e nas recaídas, utilizando-se outros marcadores genéticos.

Em trabalho anterior, a influência da irradiação X e da diluição de esporozoítas nos padrões de recaída foi estudada (WARREN et al., 1974). Verificou-se que as recaídas eram causadas por esporozoítas individuais pois o número de esporozoítas no inóculo era diretamente proporcional à frequência das recaídas. Consequentemente, após a descoberta do hipnozoíta (KROTOSKI et al., 1982), que corresponde a uma forma latente decorrente da entrada de um esporozoíta na célula hepática, concluiu-se que as recaídas eram clonais, ou seja, decorrentes da ativação de apenas um hipnozoíta. Entretanto, neste trabalho, utilizando-se amostras de *P. vivax* provenientes da

Região Amazônica, onde há uma elevada frequência de indivíduos portadores de infecções mistas (PORTO et al., 1992), foi possível identificar recaídas que surgiram a partir da ativação de dois ou mais hipnozoítas, visto que o gene da PvMSP1 se apresenta em cópia única e os parasitas durante os estágios sanguíneos são haplóides. Essa é a primeira vez que se demonstra que, pelo menos em alguns casos, as recaídas não são clonais.

O aspecto mais difícil em relação ao estudo das recaídas causadas por *P. vivax* é nosso completo desconhecimento de sua função biológica ou do estímulo que ativa os hipnozoítas. A resposta imune humoral contra a MSP1 tem demonstrado que esta proteína é altamente imunogênica em infecções naturais e que há correlação com imunidade adquirida (HOLDER & RILEY, 1996). Ainda, estudos recentes têm demonstrado que a região C-terminal da molécula da MSP1 de *P. vivax* (PvMSP1₁₉) é a porção mais imunogênica da proteína em infecções naturais (SOARES et al., 1997). Portanto, na tentativa de determinar se os anticorpos podem desenvolver alguma função nas recaídas, a resposta IgG específica contra PvMSP1₁₉ de 7 pacientes foi analisada durante o ataque primário e durante a recaída. Os resultados demonstraram que os títulos de anticorpos e sua afinidade sofrem um aumento no momento da recaída causada por *P. vivax*. Por outro lado, comparando os resultados obtidos com pacientes que não recaíram, verificamos uma importante diferença na afinidade de anticorpos, indicando que estes poderiam evitar as recaídas através da eliminação dos parasitas, se as subclasses citofílicas (BOUHAROUN-TAYOUN & DRUILHE, 1992), os títulos e a afinidade destes anticorpos permanecerem altos por 6 meses, durante a ativação dos hipnozoítas. Esta hipótese será testada pela análise da resposta IgG específica naturalmente adquirida em soros coletados após o período de acompanhamento de pacientes que não apresentaram recaídas.

ANEXO I

Composição das soluções e tampões empregados:

20 X SSC	3 M NaCl, 0.3 M citrato de sódio pH 7.0
DNA de esperma de salmão 10 mg/ml	3 ml sol. estoque (30 mg/ml), 300 µl 10 N NaOH 60 µl EDTA pH 8.0 (volume final 10 ml)
Etanol/acetato de amônio	5,5 ml acetato de amônio 10 M + 44,5 ml etanol absoluto
FSB	100 mM KCl, 45 mM MnCl ₂ x 4 H ₂ O, 10 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 3 mM HAcOCl ₃ , 10 mM acetato de potássio pH 7.5, 10% (v/v) glicerol redestilado
LB	1% bacto-triptona, 0.5% extrato de levedura, 1% NaCl, Ph 7.0
LB - ágar - amp	LB-ágar + 100 µg/ml ampicilina
LB-ágar	LB + 1.5% bacto-ágar
LB-amp-tet	LB + 100 µg/ml ampicilina + 12.5 µg/ml tetraciclina
PBS	150 mM NaCl, 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ , 7,4 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
SOB	2% bacto-triptona, 0.5% extrato de levedura, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.0
SOC	SOB + 10 mM MgCl ₂ , 20 mM glicose
Solução 1	2 M glucose, 1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0, 1% de RNase (10 mg/ml)
Solução 2	200 mM NaOH, 1% SDS
Solução 3	2 M CH ₃ COOK
Solução de acrilamida 20%	19,3% acrilamida, 46,7% uréia 0,67% N,N' - metileno-bis-acrilamida
Solução de Pré-hibridização I	6 X SSC, 0.1% SDS, 4% (p/v) leite Molico DNA de esperma de salmão 100 µg/ml
Solução de Pré-hibridização II	6 X SSC, 5 X Denhardt's, 0.5% SDS, DNA de esperma de salmão 100 µg/ml
Solução de Denaturação	1.5M NaCl, 0.5N NaOH

Composição das soluções e tampões empregados (continuação):

Solução de Neutralização para filtros	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris Hcl pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0
Tampão PK	20 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.5% Tween 20, 10 mg/ml Proteinase K (Promega)
TBE	0,089 M Trizma base, 0,0089 M ácido bórico, pH 8.0 0,5 mM EDTA
TBE 10X	1M Trizma-base, 20 mM EDTA, 0,86 M ácido bórico
TE	1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4

ANEXO II

Conjugados utilizados:

Anti IgG humano:

- Imunoglobulina de cabra anti IgG humana, Fc, conjugada à peroxidase - Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc. Gaithersburg.
- Imunoglobulina de camundongo anti IgG1 humana - Sigma
- Imunoglobulina de camundongo anti IgG2 humana - Sigma
- Imunoglobulina de camundongo anti IgG3 humana - Sigma
- Imunoglobulina de camundongo anti IgG4 humana - Sigma

Anti IgG de camundongo:

- Imunoglobulina de cabra anti IgG de camundongo, molécula total, conjugada à peroxidase - Sigma

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERQUO, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo, Pedagógica e Universitária, 1981.

BOUHAROUN-TAYOUN, H. & DRUILHE, P. *Plasmodium falciparum* malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity. **Infect. Immun.**, **60**:1473-81, 1992.

BOULOS, M.; AMATO NETO, V.; DUTRA, A.P.; DI SANTI, S.M.; SHIROMA, M. Frequency of malaria relapse due to *Plasmodium vivax* in a non-endemic region (São Paulo, Brazil). **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, **33**: 143-6, 1991.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**:248-54, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Gerência Técnica de Malária. **Dados Epidemiológicos de Malária**, Brasília, 1996.

BRUCE-CHWATT, L.J. **Quimioterapia del Paludismo**. 2. ed. Ginebra, Organizacion Mundial de la Salud, 1982.

BRUCE-CHWATT, L.J. **Essential Malariology**. 2. ed. London, William Heinemann Medical Books, 1985.

* DE ACORDO COM:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências bibliográficas: NB-66. In.---. **Normas ABNT sobre documentação**. Rio de Janeiro, 1978. p. 13-20. SERIAL sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1990.

- BUNNAG, D.; KARBWANG, J.; THANAVIBUL, A.; CHITTAMAS, S.; RATANAPONGSE, Y.; CHALERMRUT, K.; BANGCHANG, K.N.; HARINASUTA, T. High dose of primaquine in primaquine resistant vivax malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **88**:218-9, 1994.
- CHENG, Q.; STOWERS, A.; HUANG, T.W.; BUSTOS, D.; HUANG, Y.M.; RZEPCZYK, C.; SAUL, A. Polimorphism in *Plasmodium vivax* MSA1 gene - the result of intragenic recombinations? **Parasitology**, **106**:335-45, 1993.
- COATNEY, G.R. Relapse in malaria - an enigma. **J. Parasitol.**, **62**:3-9, 1976.
- COATNEY, G.R.; COOPER, W.C.; RUHE, D.S. Studies in human malaria. VI. The organization of a program for testing potential antimalarial drugs in prisoner volunteers. **Am. J. Hyg.**, **47**:113-9, 1948.
- COATNEY, G.R.; COLLINS, W.E.; WARREN, MCW; CONTACOS, P.G. **The Primate Malarias**. Washington. U.S. Government Printing Office, 1971, apud KROTOSKI, 1985.
- COLLINS, W.E. & JEFFERY, G.M. Primaquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, **55**:243-9, 1996.
- CONTACOS, P.G. & COLLINS, W.E. Malarial relapse mechanism. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **67**:617-8, 1973.
- CRAIG, A.A. & KAIN, K.C. Molecular Analysis of Strains of *Plasmodium vivax* from Paired Primary and Relapse Infections. **J. Infect. Dis.**, **174**:373-9, 1996.

DEL PORTILLO, H.A.; LONGACRE, S.; KHOURI, E.; DAVID, P.H. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**:4030-4, 1991.

DEL PORTILLO, H.A.; BARREIRO, L.; CAMARGO, A.A.; LEVITT, A. Amplification of single-copy genes of *Plasmodium vivax* from two drops of peripheral blood of infected patients. **J. Protozool. Res.**, **3**:20-4, 1993.

FERREIRA, M.U. & KATZIN, A.M. The assessment of antibody affinity distribution by thiocyanate elution: a simple dose-response approach. **J. Immunol. Methods**, **187**:297-305, 1995.

GALINSKI, M.R. & BARNWELL, J.W. *Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitol. Today**, **12**:20-9, 1996.

GARNHAM, P.C.C. The continuing mystery of relapses in malaria. **Protozool. Abs.**, **1**:1-12, 1977.

GASCON, J.; GOMEZ ARCE, J.E.; MENENDEZ, C.; VALLS, M.E.; CORACHÁN, M. Poor response to primaquine in two cases of *Plasmodium vivax* malaria from Guatemala. **Trop. Geogr. Med.**, **46**:32-7, 1994.

GIBSON, H.L.; TUCKER, J.E.; KASLOW, D.C.; KRETTLI, A.U.; COLLINS, W.E.; KIEFER, M.C.; BATHURST, I.C.; BARR, P.J. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **50**:325-34, 1992.

HOLDER, A.A. & FREEMAN, R.R. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **J. Exp. Med.**, **156**:1528-38, 1982.

HOLDER, A.A. & BLACKMAN, M.J. What is the function of MSP-1 on the malaria merozoite? **Parasitol. Today**, **10**:182-4, 1994.

HOLDER, A.A. & RILEY, E.M. Human immune response to MSP1. **Parasitol. Today**, **12**:173-4, 1996.

KOLAKOVICH, K.A.; SSENGOBA, A.; WOICIK, K.; TSUBOI, T.; AL-YAMAN, F.; ALPERS, M.; ADAMS, J.H. *Plasmodium vivax*: favored gene frequencies of the Merozoite Surface Protein - 1 and the multiplicity of infection in a malaria endemic region. **Exp. Parasitol.**, **83**:11-8, 1996.

KROTOSKI, W.A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **79**:1-11, 1985.

KROTOSKI, W.A.; GARNHAM, P.C.C.; BRAY, R.S.; KROTOSKI, D.M.; KILLICK-KENDRICK, R.; DRAPER, C.C.; TARGETT, G.A.T.; GUY, M.W. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **31**:24-35, 1982a.

KROTOSKI, W.A.; COLLINS, W.E.; BRAY, R.S.; GARNHAM, P.C.C.; COGSWELL, F.B.; GWADZ, R.W.; KILLICK-KENDRICK, R.; WOLF, R.; SINDEN, R.; KOONTZ, L.C.; STANFILL, P.S. Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **31**:1291-3, 1982b.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)**, **227**:680-5, 1970.
- LEVITUS, G.; MERTENS, F.; SPERANÇA, M.A.; CAMARGO, L.M.A.; FERREIRA, M.U.; DEL PORTILLO, H.A. Characterization of naturally acquired human IgG responses against the N-terminal region of the merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **51**:68 - 76, 1994.
- LYSENKO, A.J.; BELJAEV, A.E.; RYBALKA, V.M. Population studies of *Plasmodium vivax*. I. The theory of polymorphism of sporozoites and epidemiological phenomena of tertian malaria. **Bull. WHO.**, **55**:541-9, 1977.
- MANCILLA, L.I.; LEVITUS, G.; KIRCHGATTER, K.; MERTENS, F.; HERRERA, S.; DEL PORTILLO, H.A. *Plasmodium vivax*: Dimorphic DNA Sequences from the MSP-1 Gene Code for Regions That Are Immunogenic in Natural Infections. **Exp. Parasitol.**, **79**:148-58, 1994.
- MANSON, P.T. Experimental malaria: recurrence after nine months. **Br. Med. J.**, **ii**:77, 1901, apud KROTOSKI, 1985, p. 1.
- MARKUS, M.B. Possible support for the sporozoite hypothesis of relapse and latency in malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **70**:535, 1976.
- MOSHKOVSKY, S.D. Explanation for the difference of incubation type and features of alternation of acute periods of tertian malaria associated with different strains of *Plasmodium vivax*. **Medskaya Parazit.**, **42**:393-400, 1973, apud COATNEY, 1976, p. 6.

- NICOLAIEV, B.P. Subspecies of the parasite of tertian malaria (*Plasmodium vivax*). **Proc. Acad. Sci. USSR**, **67**:201-10, 1949, apud BRUCE-CHWATT, 1985, p. 7.
- PORTO, M.; FERREIRA, M.U.; CAMARGO, L.M.A.; PREMAWANSA, S.; DEL PORTILLO, H.A. Second form in a segment of the Merozoite Surface Protein 1 gene of *Plasmodium vivax* among isolates from Rondônia (Brazil). **Mol. Biochem. Parasitol.**, **54**:121-4, 1992.
- PREMAWANSA, S.; SNEWIN, V.A.; KHOURY, E.; MENDIS, K.N.; DAVID, P.H. *Plasmodium vivax*: recombination between potential allelic types of the merozoite surface protein MSP1 in parasites isolated from patients. **Exp. Parasitol.**, **76**:192-9, 1993.
- PUTAPORNTIP, C.; JONGWUTIWES, S.; TANABE, K.; THAITHONG, S. Interallelic recombination in the merozoite surface protein 1 (*MSP-1*) gene of *Plasmodium vivax* from Thai isolates. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **84**:49-56, 1997.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **74**:5463-7, 1977.
- SÃO PAULO. (Estado). Secretaria da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. **Manual de Terapêutica de Malária**, São Paulo, 1987.

SÃO PAULO. (Estado). Secretaria da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. **Avaliação do Programa de Controle de Malária no Estado de São Paulo, período 1992 a 1994**, São Paulo, 1995.

SHARMA, R.C.; GAUTAM, A.S.; ORLOV, V.; SHARMA, V.P. Relapse pattern of *Plasmodium vivax* in Kheda District, Gujarat. **Indian J. Malariol.**, **27**:95-9, 1990.

SHORTT, H.E. & GARNHAM, P.C.C. Demonstration of a persisting exoerythrocytic cycle in *Plasmodium cynomolgi* and its bearing on the production of relapses. **Br. Med. J.**, **i**:1225-8, 1948.

SHORTT, H.E. GARNHAM, P.C.C.; COVELL, G.; SHUTE, P.G. The pre-erythrocytic stage of human malaria, *Plasmodium vivax*. **Br. Med. J.**, **i**:547, 1948.

SHUTE, P.G. Latency and long-term relapses in benign tertian malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **40**:189-200, 1946.

SINHA, S.; DUA, V.K.; SHARMA, V.P. Efficacy of 5 day radical treatment of primaquine in *Plasmodium vivax* cases at the BHEL industrial complex, Hardwar (U.P.). **Indian J. Malariol.**, **26**:83-6, 1989.

SOARES, I.; LEVITUS, G.; DE SOUZA, J.M.; DEL PORTILLO, H.A.; RODRIGUES, M. Acquired immune responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect. Immun.**, **65**, 1997. (no prelo).

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. **J. Mol. Biol.**, **98**:503, 1975.

THAYER, W.A. **Lectures on the Malarial Fevers**. New York. D. Appleton & Co., 1897, apud KROTOSKI, 1985, p. 1.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F.J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**:2414-8, 1990.

WARREN, MCW & GARNHAM, P.C.C. *Plasmodium cynomolgi*: X-irradiation and development of exoerythrocytic schizonts in *Macaca mulatta*. **Exp. Parasitol.**, **28**:551-6, 1970.

WARREN, MCW.; POWERS, K.G.; GARNHAM, P.C.C.; SHIROISHI, T. *Plasmodium cynomolgi*: influence of X-irradiation and sporozoite dilution on relapse patterns in infected rhesus monkeys. **Exp. Parasitol.**, **35**:266-71, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Terminology of malaria and malaria eradication**, 1963, apud COATNEY, 1976, p. 3.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World malaria situation in 1993. **Weekly Epidemiol. Rec.**, **71**:17-48, 1996.

ABSTRACT

Plasmodium vivax is the most widely distributed human malarial parasite causing an estimated 35 million cases annually. In some parts of the world, including Brazil where it reaches almost 70% of malaria cases, this is the most prevalent species. Unlike *P. falciparum*, *P. vivax* has hypnozoites, hepatocyte dormant stages that cause clinical and parasitological relapses. Unfortunately, the molecular basis of relapses remain poorly understood. This work compared paired primary attack and relapse samples obtained from 10 infected patients from the Brazilian Amazon Region using a polymorphic segment of the gene encoding the Merozoite Surface Protein 1 (PvMSP1) as a genetic marker. PCR, Southern blot and DNA sequence analysis demonstrated that the parasite population from the primary attack is identical to the one arising during relapses and that the activation of hypnozoites is not clonal; moreover, a large percentage (40%) of mixed infections, were detected. Studies on the naturally acquired human specific IgG response of these patients against the C-terminal region of the PvMSP1 molecule, the most immunogenic region, demonstrated an increase in the titers, affinity maturation and a predominance of the IgG₁ subclass during the relapse.