



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Caracterização de múltiplos polimorfismos de *Pneumocystis jirovecii*  
por *Multiplex-PCR/Single Base Extension***

Camila Borges Fernandes

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**JANEIRO, 2013**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Caracterização de múltiplos polimorfismos de *Pneumocystis jirovecii*  
por *Multiplex-PCR/Single Base Extension***

**Mestranda:** Camila Borges Fernandes

**Orientadora:** Professora Doutora Olga Matos

**Co-orientador:** Doutor Francisco Esteves

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

**JANEIRO, 2013**



## RESUMO

### Caracterização de múltiplos polimorfismos de *Pneumocystis jirovecii* por *Multiplex-PCR/Single Base Extension*

Camila Borges Fernandes

*Pneumocystis jirovecii* é conhecido por causar infecções específicas no aparelho respiratório de seus hospedeiros, principalmente em doentes imunocomprometidos, manifestando-se por uma pneumonia grave e por vezes fatal, normalmente designada por pneumonia por *Pneumocystis*. A caracterização da diversidade genética de *P. jirovecii* tem demonstrado que determinados polimorfismos de base única poderão ser reconhecidos como marcadores moleculares de eleição para o estudo da distribuição geográfica, vias de transmissão, resistência/susceptibilidade a fármacos, factores de virulência e genética populacional de subtipos genéticos. Este estudo teve como objectivo a caracterização de polimorfismos de *P. jirovecii*, através da metodologia PCR *multiplex*/Extensão de base única (do inglês *single base extension*), com a principal finalidade de constatar eventuais associações entre polimorfismos de base única, genótipos *multilocus*, e dados clínicos e demográficos da infecção. Sessenta e seis espécimes pulmonares, previamente considerados positivos para *P. jirovecii*, obtidos entre 2001 e 2012, a partir de doentes portugueses imunocomprometidos, foram seleccionados de forma aleatória para este estudo *multilocus*. PCR *multiplex* foi utilizada para a amplificação simultânea de três regiões genómicas: subunidade grande do rRNA mitocondrial, superóxido dismutase e dihidropteroato sintetase. Cinco polimorfismos de base única, previamente correlacionados com parâmetros da doença, foram genotipados por extensão de base única: *mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*. Um total de 330 polimorfismos de base única e 29 genótipos *multilocus* putativos de *P. jirovecii* foram identificados e caracterizados nos espécimes pulmonares analisados. Os padrões de distribuição dos polimorfismos foram analisados, sendo considerada a variação temporal e/ou geográfica das suas formas alélicas. Constatou-se grande diversidade genotípica entre os isolados de *P. jirovecii* que poderá ter influência a nível epidemiológico. Foram observadas associações estatísticas entre *mt85*/genótipos *multilocus* e parâmetros demográficos e clínicos. A correlação mais importante verificou-se entre *mt85C* e cargas parasitárias baixas a moderadas, enquanto *mt85T* foi associado com cargas parasitárias altas; MLG5, MLG9 e MLG13 foram associados com cargas parasitárias baixas, moderadas e altas, respectivamente. Tais associações demonstram que potenciais marcadores moleculares da infecção por *P. jirovecii* poderão existir e que polimorfismos/genótipos específicos poderão determinar perfis epidemiológicos da pneumonia por *Pneumocystis*. A análise genética cruzada permitiu verificar associações entre polimorfismos de base única. Os polimorfismos *SOD110T* e *SOD215C*, *SOD110C* e *SOD215T*, *DHPS165A* e *DHPS171C*, *DHPS165G* e *DHPS171T* foram associados estatisticamente. Os genótipos *multilocus* mais prevalentes foram considerados para o teste recombinatório d1. Dois genótipos *multilocus* (MLG7 e MLG9) foram observados com elevada frequência, e a análise genética indicou que estes se encontravam sobre-representados na população de *P. jirovecii* estudada. Estas evidências indicam que o fenómeno de desequilíbrio de ligação e a propagação clonal de subtipos genéticos é frequente, considerando que a espécie *P. jirovecii* poderá ser representada por uma população com estrutura epidémica. O presente trabalho

confirmou a importância do estudo de polimorfismos em *P. jirovecii*, sugerindo que a caracterização *multilocus* poderá fornecer informação relevante para a compreensão dos padrões, causas e controlo da infecção, melhorando assim a investigação deste importante patógeno.

**Palavras-chaves:** *Pneumocystis jirovecii*, genotipagem *multilocus*, epidemiologia.

## ABSTRACT

### Characterization of multiple polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* by Multiplex-PCR/Single Base Extension

Camila Borges Fernandes

*Pneumocystis jirovecii* is known for causing specific infections in the respiratory tract of humans, mostly in immunocompromised patients, leading to a severe, and often fatal, pneumonia known as *Pneumocystis* pneumonia. The characterization of the genetic diversity of *P. jirovecii* has shown that some specific single nucleotide polymorphisms have been recognized as the molecular markers of choice to study the geographical distribution, modes of transmission, drug susceptibility/resistance, virulence factors and population genetics of specific genetic subtypes. The goal of the present work was to characterize *P. jirovecii* polymorphisms, using the methodology Multiplex PCR/Single Base Extension, having as main purpose, the detection of possible associations between single nucleotide polymorphisms and multilocus genotypes with demographic and clinical data of infection by *P. jirovecii*. Sixty six pulmonary specimens previously identified as positive for *P. jirovecii*, collected between 2001 and 2012, from immunocompromised portuguese patients were randomly selected and included in this multilocus study. Multiplex-PCR was used for simultaneous amplification of three genomic regions: mitochondrial large-subunit rRNA, superoxide dismutase and dihydropteroate synthase. Five single nucleotide polymorphisms correlated previously with parameters of disease were genotyped by Single Base Extension: *mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* and *DHPS171*. A total of 330 single nucleotide polymorphisms and 29 potential *P. jirovecii* multilocus genotypes were identified and characterized in the samples studied. The polymorphisms distribution patterns were analyzed and the temporal and/or geographic variation of their allelic forms have been considered. There was a large genotypic diversity among isolates of *P. jirovecii* that may have influenced the epidemiology of infection. Statistical associations between *mt85*/multilocus genotypes and some demographic and clinical informations were observed. The most relevant correlation was observed between *mt85C* with low to moderate parasite load, whilst *mt85T* was associated with high parasite load. MLG5, MLG9 and MLG13 were associated with low, moderate and high parasite load, respectively. Such associations demonstrate that optimal molecular markers of infection by *P. jirovecii* exist and specific polymorphisms/genotypes may determine specific epidemiological profiles of *Pneumocystis* pneumonia. The cross-genetic analysis demonstrated statistically significant associations among single nucleotide polymorphisms. The polymorphisms *SOD110T* and *SOD215C*, *SOD110C* and *SOD215T*, *DHPS165A* and *DHPS171C*, *DHPS165G* and *DHPS171T*, were statistically associated. The most prevalent multilocus genotypes identified were considered in the recombination test d1. Two multilocus genotypes (MLG7 and MLG9) were observed in higher frequency, and the genetic analysis indicated at these multilocus genotypes are over-represented in the population of *P. jirovecii* studied. These evidences indicate that linkage disequilibrium and clonal propagation of genetic genotypes is common in this population, considering that the species *P. jirovecii* could be represented by an epidemic population structure. The present work confirmed the importance of the study of polymorphisms in *P. jirovecii*, suggesting that the multilocus characterization can provide useful

information to understanding the patterns, causes and control of infection, enhancing the research of this important pathogen.

**Keywords:** *Pneumocystis jirovecii*, multilocus genotyping, epidemiology.

# ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FÍGURAS.....	iv
ÍNDICE DE QUADROS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Género <i>Pneumocystis</i> .....	2
1.2. Critérios taxonómicos, classificação sistemática e diversidade específica do género <i>Pneumocystis</i> .....	4
1.3. Ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> spp. e principais características morfológicas .....	8
1.4. Importância clínica da PPc nos humanos.....	12
1.5. Principais conceitos epidemiológicos da infecção por <i>P. jirovecii</i> .....	15
1.5.1. Modos de infecção.....	15
1.5.2. Transmissão e possíveis reservatórios .....	17
1.6. Apresentação e diagnóstico da PPc .....	21
1.6.1. Critérios clínicos.....	21
1.6.2. Detecção microscópica de <i>P. jirovecii</i> .....	23
1.6.3. Detecção molecular de <i>P. jirovecii</i> .....	25
1.7. Tratamento e profilaxia da PPc .....	27
1.8. Heterogeneidade intra-específica em <i>P. jirovecii</i> .....	30
1.8.1. Caracterização molecular.....	30
1.8.2. Genotipagem de <i>P. jirovecii</i> e possível relação com parâmetros epidemiológicos ..	31
1.8.2.1. Polimorfismos em mtLSU rRNA e sua importância clínica e epidemiológica ..	32
1.8.2.2. Polimorfismos em SOD e sua importância clínica e epidemiológica .....	33
1.8.2.3. Polimorfismos em CYB e sua importância clínica e epidemiológica .....	35
1.8.2.4. Polimorfismos em DHPS e DHFR e sua importância clínica e epidemiológica ..	39
1.8.3. Aplicabilidade e importância epidemiológica da genotipagem <i>multilocus</i> em <i>P. jirovecii</i> .....	46
<b>OBJECTIVOS .....</b>	<b>48</b>

<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>Considerações prévias.....</b>	<b>50</b>
2.1. Caracterização da amostra/População em estudo.....	52
2.2. Processamento de amostras respiratórias – secreções pulmonares .....	53
2.2.1. Processamento de amostras de LBA.....	53
2.2.2. Processamento de amostras de EI.....	54
2.3. Identificação de <i>P. jirovecii</i> nos produtos biológicos processados .....	55
2.3.1. Diagnóstico parasitológico – detecção microscópica de quistos de <i>P. jirovecii</i> por IFI com AcM.....	55
2.3.2. Diagnóstico molecular – amplificação do <i>locus</i> mtLSU rRNA pela <i>nested</i> -PCR.....	56
2.3.2.1. Extracção de DNA genómico pelo método de mini beadbeeter/tiocinato de guanidina-sílica .....	57
2.3.2.2. Amplificação do <i>locus</i> mtLSU rRNA pela <i>nested</i> -PCR .....	58
2.3.3. Determinação da carga parasitária.....	61
2.4. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos .....	62
2.4.1. Caracterização genética de isolados – estudo preliminar dos genes CYB e DHPS ..	63
2.4.2. Amplificação dos <i>loci</i> CYB e DHPS pela PCR .....	63
2.4.3. Purificação dos produtos de PCR.....	65
2.4.4. Sequenciação directa e análise das sequências.....	66
2.5. Genotipagem <i>multilocus</i> – metodologia MPCR/SBE.....	68
2.5.1. Amplificação pela MPCR.....	71
2.5.2. Purificação dos produtos de MPCR.....	75
2.5.3. Sequenciação pela técnica SBE.....	75
2.6. Interpretação dos resultados .....	79
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
3.1. Características demográficas e clínicas da população em estudo.....	82
3.2. Diagnóstico laboratorial.....	86
3.3. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos .....	88
3.3.1. Análise e caracterização genética de isolados – <i>locus</i> CYB .....	88
3.3.2. Análise e caracterização genética de isolados – <i>locus</i> DHPS .....	92

3.4. Amplificação pela MPCR.....	94
3.5. Genotipagem pela técnica SBE.....	97
3.6. Análise estatística .....	102
3.6.1. Análise estatística descritiva entre os SNPs e dados demográficos e clínicos .....	102
3.6.2. Análise estatística descritiva entre os MLGs e dados demográficos e clínicos.....	109
3.6.3. Análise estatística descritiva entre os SNPs.....	111
3.7. Análise genética .....	112
<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>114</b>
4.1. Análise dos resultados da caracterização genética de isolados nos <i>loci</i> CYB e DHPS (Estudo prévio) .....	115
4.2. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos .....	116
4.3. Padrões de distribuição dos SNPs em estudo, caracterizados pela metodologia MPCR/SBE.....	120
4.3.1. Distribuição da frequência do SNP <i>mt85</i> .....	120
4.3.2. Distribuição da frequência dos SNPs <i>SOD110</i> e <i>SOD215</i> .....	122
4.3.3. Distribuição da frequência dos SNPs <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> .....	123
4.4. Diversidade genotípica nos isolados de <i>P. jirovecii</i> encontrada através da metodologia MPCR/SBE.....	127
4.5. Provável importância epidemiológica da diversidade genética de <i>P. jirovecii</i> com parâmetros da infecção.....	129
4.5.1. Relação entre SNPs/MLGs e parâmetros demográficos .....	129
4.5.2. Relação entre SNPs/MLGs e parâmetros clínicos .....	131
4.6. Análise de associações não aleatórias entre os SNPs – desequilíbrio de ligação .....	138
4.7. Abordagem populacional – estudo da clonalidade da espécie <i>P. jirovecii</i> .....	140
4.8. Aplicabilidade da metodologia MPCR/SBE.....	141
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>143</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>165</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árvore filogenética de sequências nucleotídicas do gene 18S rRNA de diferentes espécies do Reino <i>Fungi</i> e da espécie <i>Pneumocystis carinii</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Árvore filogenética do género <i>Pneumocystis</i> , a partir da análise de sequências nucleotídicas dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA .....	7
<b>Figura 3.</b> Ilustração das principais estruturas celulares das formas morfológicas, trofozoíto (A) e quisto (B), de <i>Pneumocystis</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Ilustração do ciclo de vida de <i>Pneumocystis</i> spp .....	11
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática das prováveis vias de exposições em indivíduos susceptíveis de desenvolver a PPc .....	20
<b>Figura 6.</b> Detecção microscópica de formas morfológicas de <i>Pneumocystis</i> em LBA .....	24
<b>Figura 7.</b> Detecção microscópica de quistos de <i>P. jirovecii</i> em LBA por IFI com AcM .....	25
<b>Figura 8.</b> Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de mtLSU rRNA de <i>P. jirovecii</i> .....	33
<b>Figura 9.</b> Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de SOD de <i>P. jirovecii</i> .....	35
<b>Figura 10.</b> Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de CYB de <i>P. jirovecii</i> .....	38
<b>Figura 11.</b> Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de DHPS de <i>P. jirovecii</i> .....	42
<b>Figura 12.</b> Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de DHFR de <i>P. jirovecii</i> .....	44
<b>Figura 13.</b> Ilustração da metodologia MPCR/SBE .....	71
<b>Figura 14.</b> Representação esquemática das etapas essenciais da metodologia MPCR/SBE .....	78
<b>Figura 15.</b> Alinhamento entre sequências nucleotídicas do gene CYB .....	90
<b>Figura 16.</b> Electroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação pela PCR dos genes DHPS, mtLSU rRNA e SOD em isolados de <i>P. jirovecii</i> .....	95

<b>Figura 17.</b> Electroforese em gel de agarose (1.5%) dos produtos de amplificação <i>multiplex</i> dos genes DHPS, mtLSU rRNA e SOD em isolados de <i>P. jirovecii</i> .	96
<b>Figura 18.</b> Cromatograma obtido por sequenciação SBE através de electroforese capilar, para a genotipagem <i>multilocus</i> dos SNPs <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> , <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> , de um isolado de <i>P. jirovecii</i>	98

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro I.</b> Características dos <i>primers</i> utilizados para o diagnóstico molecular por amplificação do gene mtLSU rRNA pela <i>nested</i> -PCR .....	59
<b>Quadro II.</b> Condições térmicas de amplificação do gene mtLSU rRNA de <i>P. jirovecii</i> utilizadas nas duas etapas da <i>nested</i> -PCR .....	60
<b>Quadro III.</b> Quantificação da carga parasitária das amostras .....	61
<b>Quadro IV.</b> Características dos pares de <i>primers</i> utilizados para o estudo do gene DHPS e CYB pela PCR .....	63
<b>Quadro V.</b> Condições térmicas de amplificação dos genes CYB e DHPS de <i>P. jirovecii</i> pela PCR .....	64
<b>Quadro VI.</b> Representação dos três <i>loci</i> em estudo, bem como dos respectivos SNPs de interesse .....	68
<b>Quadro VII.</b> <i>Primers</i> utilizados para a amplificação pela MPCR dos três <i>loci</i> de interesse polimórfico (mtLSU rRNA, SOD e DHPS), bem como as sequências nucleotídicas utilizadas como TAG- <i>primer</i> SBE para a sequenciação por SBE e genotipagem dos cinco SNPs considerados como os mais relevantes ( <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> , <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> ) .....	72
<b>Quadro VIII.</b> Características do par de <i>primers</i> SODFw2 e SODRw3 utilizado para o estudo <i>multiplex</i> .....	73
<b>Quadro IX.</b> Programas utilizados para a otimização da MPCR .....	74
<b>Quadro X.</b> Informações clínicas referentes aos doentes estudados .....	83
<b>Quadro XI.</b> Definição dos grupos tendo em conta os resultados obtidos laboratorialmente e o diagnóstico clínico de cada doente .....	87
<b>Quadro XII.</b> Identificação dos SNPs encontrados nas posições nucleotídicas 279, 516, 547, 566 e 838, bem como as suas respectivas frequências, após caracterização genética de sequências do gene CYB em isolados de <i>P. jirovecii</i> .....	91
<b>Quadro XIII.</b> Identificação dos SNPs encontrados nas posições nucleotídicas 165 e 171, bem como as suas respectivas frequências, após caracterização genética de sequências do gene DHPS em isolados de <i>P. jirovecii</i> .....	93

<b>Quadro XIV.</b> Resultados da genotipagem <i>multilocus</i> dos cinco SNPs considerados relevantes para o estudo (A) e respectivas frequências (B), após sequenciação pela técnica SBE .....	99
<b>Quadro XV.</b> MLGs putativos identificados nos 66 isolados de <i>P. jirovecii</i> , e as suas respectivas frequências .....	101
<b>Quadro XVI.</b> Distribuição das frequências alélicas dos SNPs <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> , <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> em relação aos dados demográficos (Género, Grupo Etário e Estação do Ano) .....	104
<b>Quadro XVII.</b> Distribuição das frequências alélicas dos SNPs <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> , <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> em relação aos dados clínicos (Diagnóstico Clínico e Contagem de células TCD4 <sup>+</sup> ) .....	105
<b>Quadro XVIII.</b> Distribuição das frequências alélicas dos SNPs <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> , <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> em relação aos dados clínicos (Profilaxia anti-PPc, Terapia anti-PPc e Evolução Clínica) .....	107
<b>Quadro XIX.</b> Distribuição das frequências alélicas dos SNPs <i>mt85</i> , <i>SOD110</i> , <i>SOD215</i> , <i>DHPS165</i> e <i>DHPS171</i> em relação aos dados clínicos (Carga Parasitária e Grupos Clínicos)..	108
<b>Quadro XX.</b> Distribuição das frequências dos MLGs 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 em relação aos dados demográficos (Estação do Ano) e clínicos (Diagnóstico Clínico e Carga Parasitária) .....	110
<b>Quadro XXI.</b> Frequências esperadas e observadas de distribuição dos MLGs escolhidos para o cálculo do teste estatístico combinatório, bem como os respectivos valores de <i>P</i> obtidos após aplicação do teste d1 .....	111

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Distribuição das idades pelos grupos etários definidos .....	82
<b>Gráfico 2.</b> Frequência das principais características clínicas encontradas, referentes ao quadro clínico, gasimetria e imagem radiológica dos doentes analisados neste estudo, associadas com PPc .....	84
<b>Gráfico 3.</b> Frequência (em %) das formas alélicas do SNP <i>mt85</i> ( <i>mt85C</i> , <i>mt85A</i> e <i>mt85T</i> ) do gene <i>mtLSU rRNA</i> em populações de isolados de <i>P. jirovecii</i> analisadas em diferentes regiões geográficas e em diferentes períodos de tempo .....	121
<b>Gráfico 4.</b> Frequência (em %) dos genótipos mutantes de DHPS para as posições nucleotídicas 165 e 171, em populações de isolados de <i>P. jirovecii</i> analisadas em Portugal, Espanha, França e Itália, em diferentes períodos de tempo .....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>%GC</b>	Porcentagem de guanina e citosina
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de amônia
<b>5'→3'</b>	Sentido de orientação da sequência nucleotídica
<b>18S rRNA</b>	Subunidade pequena do RNA ribossômico
<b>A</b>	Adenina
<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>AcM</b>	Anticorpo monoclonal
<b>Ag</b>	Antigénio
<b>Ala</b>	Alanina
<b>AN.</b>	Número de acesso, do inglês <i>accession number</i>
<b>Arg</b>	Arginina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato, do inglês <i>adenosine triphosphate</i>
<b>β</b>	<i>Beta</i>
<b>β-TUB</b>	β-tubulina
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CYB</b>	Citocromo b, do inglês <i>cytochrome b</i>
<b>ddNTPs</b>	Didesoxirribonucleótidos trifosfatados, do inglês <i>dideoxyribonucleotide triphosphates</i>
<b>DHFR</b>	<i>Dihidrofolato reductase</i>

<b>DHPPP</b>	7,8-dihidro-6-hidroximetilpterin-pirofosfato, do inglês <i>6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate</i>
<b>DHPS</b>	<i>Dihidropteroato sintetase</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido, do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatados, do inglês <i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetra-cético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EI</b>	Expectoração induzida
<i>et al.</i>	“E outros”, do latim <i>et alii</i>
<b>E.U.A.</b>	Estados Unidos da América
<b>g</b>	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
<b>g</b>	Gramma
<b>G</b>	Guanina
<b>GMS</b>	Coloração pela metenamina prata, do inglês <i>gomon methenamine-silver</i>
<b>HAART</b>	Terapia anti-retrovírica combinada, do inglês <i>highly active antiretroviral therapy</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>Hg</b>	Mercúrio
<b>ICNB</b>	<i>Internacional Code of Botanical Nomenclature</i>
<b>IFI</b>	Imunofluorescência indirecta
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>ITS</b>	Espaçadores internos transcritos, do inglês <i>internal transcribed spacer</i>
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>kb</b>	Quilobases

<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>Leu</b>	Leucina
<b>m</b>	Massa
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MLG</b>	Genótipo <i>multilocus</i> , do inglês <i>multilocus genotype</i>
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro cúbico
<b>MnSOD</b>	Superóxido dismutase dependente de manganésio, do inglês <i>manganese superoxide dismutase</i>
<b>MPCR</b>	PCR <i>multiplex</i> , do inglês <i>Multiplex PCR</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>mtLSU rRNA</b>	Subunidade grande do rRNA mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial large-subunit rRNA</i>
<b>mtSSU rRNA</b>	Subunidade pequena do rRNA mitocondrial, do inglês <i>mitochondrial small-subunit rRNA</i>
<b>MultAlin</b>	<i>Multiple sequence alignment</i>
<b>N</b>	Número de indivíduos
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaClO<sub>4</sub></b>	Percloroato de sódio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anião superóxido

<b>OH</b>	Hidroxilo
<b>P</b>	Probabilidade
<b>P≤0,05</b>	Nível de significância igual ou inferior a 0,05
<b>PABA</b>	Ácido para-aminobenzóico, do inglês <i>para-aminobenzoic acid</i>
<b>PaO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de oxigénio
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>polimerase chain reaction</i>
<b>pH</b>	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução (-log [H <sup>+</sup> ])
<b>Phe</b>	Fenilalanina, do inglês <i>Phenylalanine</i>
<b>PPc</b>	Pneumonia por <i>Pneumocystis</i>
<b>Pro</b>	Prolina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
<b>rRNA</b>	RNA ribossómico
<b>SAP</b>	Fosfatase alcalina isolada de camarão, do inglês <i>shrimp alkaline phosphatase</i>
<b>SBE</b>	Extensão de base única, do inglês <i>single base extension</i>
<b>Ser</b>	Serina
<b>sida</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>SMZ</b>	Sulfametoxazol
<b>SNP</b>	Polimorfismo de base única, do inglês <i>single nucleotide polymorphisms</i>
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase, do inglês <i>superoxide dismutase</i>
<b>spp.</b>	Espécie
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
<b>T</b>	Timina

<b>TAE</b>	Tampão tris-acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tampão tris-borato-EDTA
<b>TBO</b>	Coloração de azul de toluidina dos inglês, <i>toluidine-blue O</i>
<b>TCD4<sup>+</sup></b>	Linfócito T com receptores de agrupamento de diferenciação 4
<b>Thr</b>	Treonina, do inglês <i>threonine</i>
<b>Tm</b>	Temperatura de desnaturação, do inglês <i>melting temperature</i>
<b>TMP</b>	Trimetoprim
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>TS</b>	<i>Timidilato sintetase</i>
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>U</b>	Unidade
<b>UNL</b>	Universidade Nova de Lisboa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v</b>	Volume
<b>V</b>	Volts
<b>VIH</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>χ<sup>2</sup></b>	Chi-quadrado

---

## ***INTRODUÇÃO***

## 1.1. Género *Pneumocystis*

No início do século passado, Carlos Chagas (Chagas 1909) ao observar uma forma morfológica nunca antes identificada, em tecido pulmonar de porquinhos-da-índia, utilizados como modelo animal para a infecção por tripanossoma, constatou erroneamente que esta poderia pertencer a um estágio do ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Um ano mais tarde, Antonio Carini (Carini 1910) descreveu formas similares em pulmões de ratos infectados com *Trypanosoma lewisi*, e suspeitou que a forma morfológica visualizada poderia ser de um novo patógeno. A constatação de uma nova entidade biológica foi confirmada em 1912 pelo casal Delanoe (Delanoe & Delanoe 1912), no Instituto Pasteur em Paris, não só pela observação dos tecidos pulmonares enviados por Carini, mas também pela identificação da forma em questão em pulmões de ratos sem infecção por tripanossoma. Desta forma, ao concluírem que estavam perante um novo microrganismo, propuseram a formação de um novo género denominado de *Pneumocystis*. “*Pneumo*”, devido à localização característica da infecção no pulmão e “*cystis*” pela forma morfológica quística encontrada (Thomas & Limper 2004; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008).

Actualmente, o género *Pneumocystis* é reconhecido por ser um grupo fúngico constituído por microrganismos eucariotas, parasitas oportunistas extracelulares obrigatórios, que infectam maioritariamente os pulmões de uma ampla gama de hospedeiros mamíferos, incluindo o homem. São responsáveis por causar infecções assintomáticas ou subclínicas na maioria dos seus hospedeiros e em casos de imunossupressão podem causar pneumonia normalmente denominada de pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) (Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009).

*Pneumocystis* é considerado um fungo atípico, com características únicas, distinto da maioria dos fungos conhecidos (Stringer 1996, 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011). A presença de uma parede celular sem ergosterol na sua constituição é uma das diferenças estruturais encontradas (Stringer 1996; Stringer *et al.* 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008), que está maioritariamente relacionada com a ineficácia dos antifúngicos tradicionais (Stringer 1996, 2002); também o mecanismo de variação antigénica de superfície, presente neste género, é incomum no grupo dos

fungos (Stringer 1996); e o facto do gene RNA ribossómico (rRNA) estar presente em uma única cópia, em vez de um elevado número de cópias, como é habitual nos eucariotas (Stringer 1996, 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008).

Ao contrário da maioria dos microrganismos patogénicos, um sistema de cultivo laboratorial a longo prazo, ainda não foi desenvolvido para *Pneumocystis*, principalmente porque as condições fastidiosas apropriadas ao seu crescimento, ainda não estão totalmente conhecidas (Stringer 1996; Aliouat-Denis *et al.* 2009). A tentativa de atingir uma forma de propagação sustentada, fora do ambiente pulmonar do hospedeiro, tem sido extensivamente estudada, por variadas técnicas, mas até agora sem sucesso, dificultando o seu estudo (Thomas & Limper 2004).

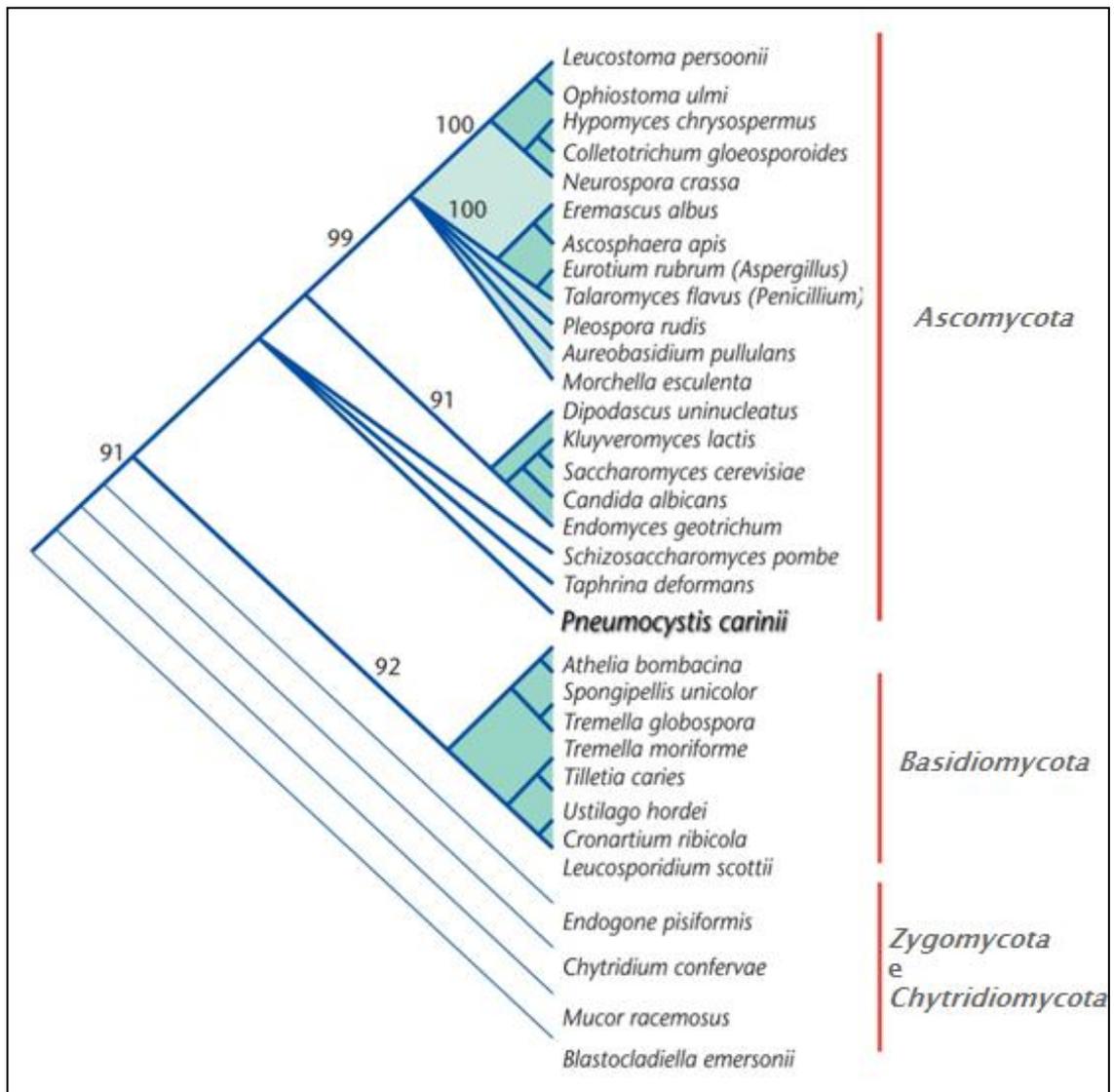
A disponibilidade de tecnologias moleculares tem permitido progressos significativos na caracterização genética, bioquímica e da biologia celular deste patógeno (Smulian 2001). Informações obtidas a partir da análise de sequências de DNA têm fornecido dados necessários para a compreensão da classificação sistemática, e do grau de heterogeneidade existente entre os microrganismos deste grupo, bem como uma melhor percepção da relação existente entre eles e os seus hospedeiros (Wakefield 1998a; Stringer *et al.* 2002); a utilização de sistemas heterólogos de expressão e a análise genómica e proteómica, têm fornecido informações úteis sobre a biologia básica e o ciclo de vida de *Pneumocystis* (Huang *et al.* 2006); o desenvolvimento de metodologias baseadas na técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), para a amplificação de genes específicos, tem permitido um estudo mais alargado sobre a infecção, e a pesquisa sobre a epidemiologia e transmissão deste patógeno (Morris *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004).

No decorrer dos últimos anos, as dificuldades inerentes ao estudo deste género têm sido minimizadas e a compreensão de muitos aspectos importantes do seu funcionamento têm sido esclarecidos (Smulian 2001; Stringer *et al.* 2002; Thomas & Limper 2004).

## 1.2. Critérios taxonómicos, classificação sistemática e diversidade específica do género *Pneumocystis*

A posição taxonómica do género *Pneumocystis* foi exaustivamente analisada devido principalmente à falta de critérios que corroboravam a sua correcta classificação no grupo dos protozoários ou dos fungos (Redhead *et al.* 2006; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011). Inicialmente foram classificados como protozoários tendo como base semelhanças morfológicas e histológicas existentes no ciclo de vida, a similaridade encontrada quanto à patologia, e à sensibilidade a agentes anti-protozoários (Stringer 1996, 2002; Stringer *et al.* 2002; Thomas & Limper 2004, 2007). Em 1988, com a determinação da sequência do gene que codifica a subunidade pequena 18S do RNA ribossómico (18S rRNA) (Edman *et al.* 1988), foi possível verificar, pela análise comparativa de sequências, uma proximidade filogenética entre *Pneumocystis* e os fungos (**Figura 1**) (Stringer 1996; Cushion 2004; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009). A relação evolutiva existente também foi confirmada pela comparação filogenética de outros genes, nomeadamente genes mitocondriais, genes que codificam proteínas e enzimas importantes, incluindo o gene da  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -TUB), actina,  *timidilato sintetase* (TS) e  *dihidrofolato reductase* (DHFR) (Stringer 1996; Aliouat-Denis *et al.* 2008), bem como a análise e isolamento de genes característicos de fungos, como o que codifica o factor de alongamento III e genes relacionados com a resposta ao  *stress* (Stringer 2002; Stringer *et al.* 2002).

Apesar da análise molecular classificar este grupo no Reino *Fungi*, a sua correcta posição sistemática não está muito bem esclarecida, sendo que alguns autores sugerem que *Pneumocystis* compreende uma linhagem evolutiva divergente, coincidente com as linhagens dos Filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (**Figura 1**) (Stringer 1996; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011). Actualmente é proposto que a sua classificação sistemática, datada de 1994 (Eriksson 1994), seja modificada para o Reino *Fungi*, Filo *Ascomycota*, Classe *Pneumocystidomycetes*, Ordem *Pneumocystidales* e Família *Pneumocystidaceae* (Stringer 1996; Redhead *et al.* 2006; Beck & Cushion 2009; Kaneshiro & Limper 2011).

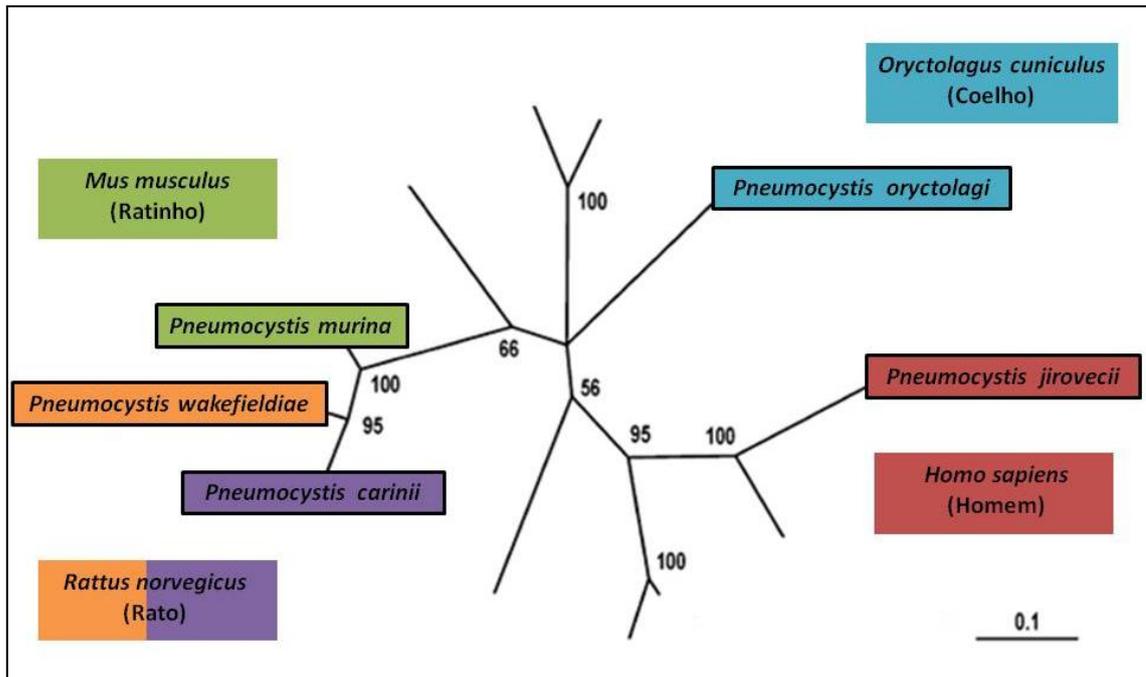


**Figura 1.** Árvore filogenética de seqüências nucleotídicas do gene 18S rRNA de diferentes espécies do Reino Fungi e da espécie *Pneumocystis carinii* (adaptado de Kaneshiro & Limper 2011).

A caracterização ao nível da espécie, do género *Pneumocystis*, também necessitou de ser revista após a reclassificação destes organismos no grupo dos fungos (Stringer *et al.* 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008). *Pneumocystis carinii* Delanoe & Delanoe 1912 era o binómio específico atribuído no início do século XX (Aliouat-Denis *et al.* 2008), e foi descrito como sendo a espécie capaz de infectar e causar doença em todos os hospedeiros mamíferos encontrados, uma vez que todos os isolados analisados eram morfologicamente e clinicamente muito semelhantes (Stringer 1996; Wakefield 1998a).

Através da aplicação de técnicas de biologia molecular a heterogeneidade de *Pneumocystis* foi estabelecida (Wakefield 1998a; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Estudos genéticos e fenotípicos demonstraram que diferentes espécies de hospedeiros, estão normalmente infectadas com formas distintas de *Pneumocystis* (Stringer 1996; Wakefield 1998a; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011), que variam principalmente a nível genómico, cariotípico, isoenzimático e antigénico (Stringer 1996; Wakefield 1998a; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Ao nível genómico, o estudo molecular foi efectuado maioritariamente pela análise de sequências de DNA que comprovam uma grande variação genética dentro do género. A constatação de variações nucleotídicas em genes como o 18S rRNA, genes mitocondriais como os que codificam a subunidade pequena (mtSSU rRNA – *mitochondrial small-subunit rRNA*) e a subunidade grande (mtLSU rRNA – *mitochondrial large-subunit rRNA*) do rRNA mitocondrial (**Figura 2**), a região de espaçadores internos transcritos (ITS – *Internal Transcribed Spacer*) do operão do rRNA nuclear, e outros *loci*, demonstraram a presença de vários genótipos, evidenciando a existência de várias espécies com divergências genéticas significativas (Stringer 1996; Wakefield 1998a; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008). Ainda demonstraram que as espécies deste género encontram-se fortemente adaptadas e possuem uma alta especificidade de hospedeiro (Wakefield 1998a; Stringer *et al.* 2002; Thomas & Limper 2004; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011). Sendo que o fenómeno de especiação encontrado poderá ser o resultado de isolamento genético e um processo co-evolutivo entre parasita e hospedeiro (Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011).

Neste momento encontram-se descritas, por critérios do ICNB, cinco espécies do género *Pneumocystis*, *Pneumocystis carinii* Delanoe & Delanoe 1912, *Pneumocystis jirovecii* Frenkel 1976, *Pneumocystis murina* Keely *et al.* 2004, *Pneumocystis wakefieldiae* Cushion *et al.* 2005 e *Pneumocystis oryctolagi* Dei-Cas *et al.* 2006 (Redhead *et al.* 2006; Beck & Cushion 2009). Até à data, *P. jirovecii* é a única espécie do género, identificada e isolada, capaz de provocar infecção e doença nos seres humanos (Wakefield 1998a; Stringer *et al.* 2002; Thomas & Limper 2004, 2007; Redhead *et al.* 2006; Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009; Kaneshiro & Limper 2011).

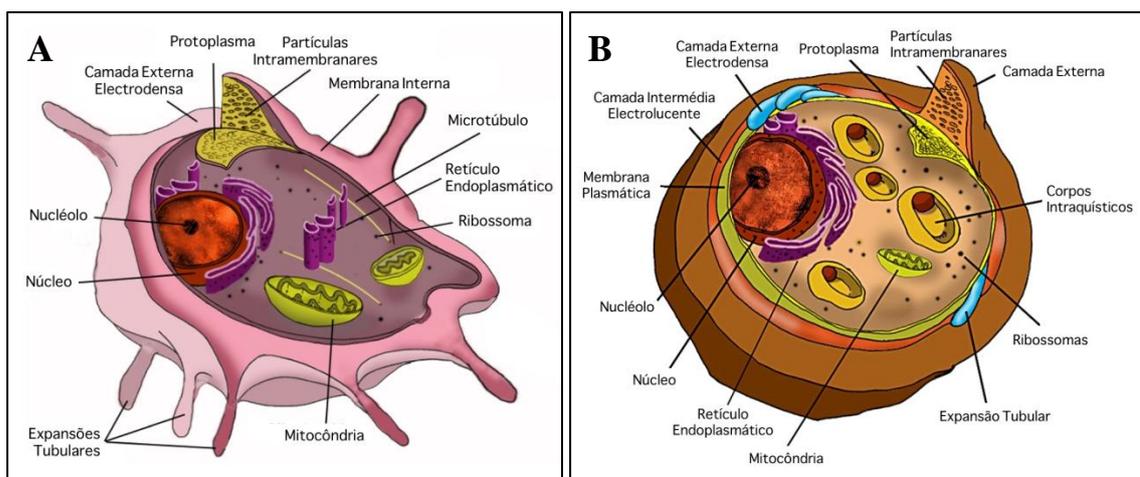


**Figura 2.** Árvore filogenética do género *Pneumocystis*, a partir da análise de sequências nucleotídicas dos genes mtLSU rRNA e mtSSU rRNA, evidenciando as cinco espécies do género descritas até à data, bem como os seus hospedeiros específicos – espécie (nome comum), representados pelas mesmas cores. Os restantes ramos representam diferentes estirpes pertencentes ao género *Pneumocystis* (adaptado e modificado de Aliouat-Denis *et al.* 2008).

### 1.3. Ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. e principais características morfológicas

Parasitas oportunistas do género *Pneumocystis* são encontrados nos pulmões de mamíferos infectados. Possuem um tropismo pulmonar dirigido maioritariamente às células alveolares do tipo I, e apenas provocam pneumonia quando o sistema imunitário dos seus hospedeiros encontra-se debilitado. Normalmente não existe disseminação para regiões extrapulmonares, contudo, o processo de invasão pode ocorrer em certos casos, como imunossupressão grave ou infecções generalizadas (Thomas & Limper 2004, 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008, 2009; CDC 2009).

Nos pulmões de um mamífero infectado podem ser observadas três formas morfológicas principais de *Pneumocystis* – trofozoíto, pré-quisto e quisto – que estão envolvidas directamente no seu ciclo de vida, sendo que as formas melhor caracterizadas do ciclo são o trofozoíto e o quisto (**Figura 3**) (Helweg-Larsen 2004; Thomas & Limper 2004, 2007; Wazir & Ansari 2004; Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009; Kaneshiro & Limper 2011). Durante o ciclo de vida, a proporção de trofozoítos em relação aos quistos chega a ser de 10:1, indicando que o trofozoíto é a forma predominante, representando aproximadamente 90 a 95% da população parasitária (Stringer 1996; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2009).



**Figura 3.** Ilustração das principais estruturas celulares das formas morfológicas, trofozoíto (A) e quisto (B), de *Pneumocystis* (adaptado de Souza & Benchimol 2005).

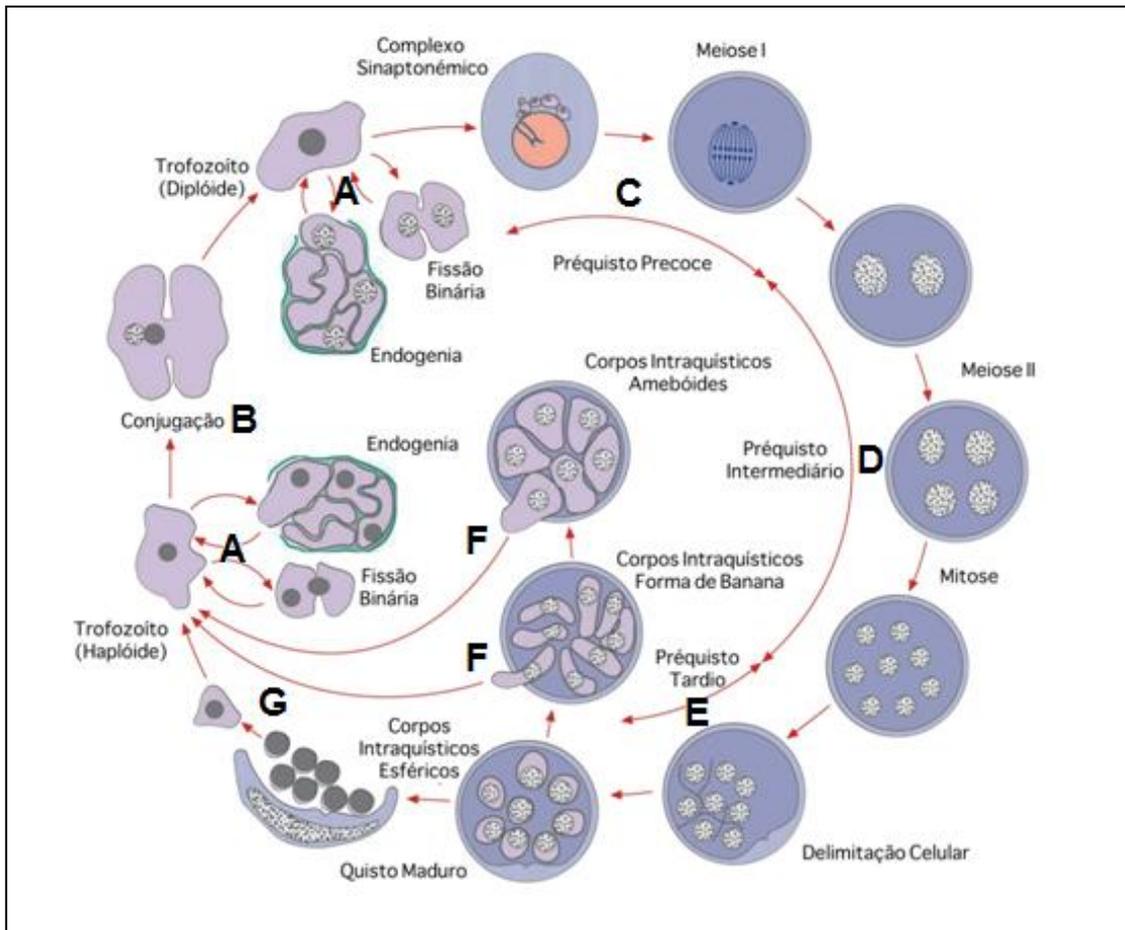
A detecção de *Pneumocystis* em amostras de secreções do aparelho respiratório, evidencia que a infecção poderá ter início pela inalação de uma possível forma infectante (Hughes 2001), sendo a via respiratória uma provável porta de entrada no hospedeiro (Kaneshiro & Limper 2011).

O estabelecimento da infecção, e o início do ciclo de vida intrapulmonar, ocorre aquando da adesão dos trofozoítos de *Pneumocystis* ao epitélio alveolar à superfície celular dos pneumócitos do tipo I, permitindo deste modo a sua proliferação (Helweg-Larsen 2004; Thomas & Limper 2004, 2007). O trofozoíto, com um diâmetro que pode variar entre 2 a 8  $\mu\text{m}$ , é unicelular e mononucleado, de parede celular fina e flexível, constituída por uma camada electrodensa e rica em  $\beta$ -glucanos e glicoproteínas; sendo o núcleo de pequenas dimensões, variando a sua posição celular, com um nucléolo de localização central ou periférica (Stringer 1996; Wazir & Ansari 2004; Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009). No citoplasma, já foram observados organelos como mitocôndrias, complexo de golgi, estruturas ramificadas que se assemelham ao retículo endoplasmático, ribossomas, grânulos de glicogénio, espaço vacuolar e microtúbulos (**Figura 3.A**) (Souza & Benchimol 2005). Estruturalmente, os trofozoítos são pleomórficos, irregulares e/ou amebóides; normalmente formam aglomerados celulares, associando-se em grupos, e possuem projecções citoplasmáticas tubulares, que auxiliam no processo de adesão aos pneumócitos (Stringer 1996; Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009).

A reprodução assexuada do ciclo de vida de *Pneumocystis* ocorre por fissão binária ou endogenia dos trofozoítos (**Figura 4.A**) (Helweg-Larsen 2004; Souza & Benchimol 2005; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2008, 2009; Beck & Cushion 2009; Kaneshiro & Limper 2011). Neste processo replicativo, pode ocorrer a fusão de dois trofozoítos haplóides, e por conjugação, seguida de cariogamia, um zigoto diplóide é formado, por reprodução sexuada (**Figura 4.B**) (Stringer 1996; Helweg-Larsen 2004; Souza & Benchimol 2005; Thomas & Limper 2007; Beck & Cushion 2009; CDC 2009; Kaneshiro & Limper 2011). O zigoto, constituído por uma parede celular fina, inicia um processo de divisão meiótica seguido por mitoses sucessivas (Stringer 1996; Helweg-Larsen 2004; Aliouat-Denis *et al.* 2009; CDC 2009). Durante esta fase, três estádios de pré-quistos – precoce, intermediário e tardio – são observados, cada um com dois, quatro e oito núcleos, respectivamente (Thomas & Limper 2007;

Aliouat-Denis *et al.* 2008; Kaneshiro & Limper 2011). O préquisto precoce é esférico, mononucleado e possui uma parede celular electrodensa, semelhante à encontrada no trofozoíto; nesta fase é possível observar o complexo sinaptonémico característico de uma célula que inicia um processo meiótico (**Figura 4.C**) (Aliouat-Denis *et al.* 2008). O préquisto intermediário é multinuclear e possui uma parede celular espessa, com uma estrutura muito semelhante à parede encontrada nos quistos de *Pneumocystis* (**Figura 4.D**) (Aliouat-Denis *et al.* 2008). O préquisto tardio, de paredes espessas, é constituído por oito núcleos não delimitados, que por processos de invaginação da membrana do préquisto, tornam-se revestidos por uma membrana, originando os corpos intraquísticos (**Figura 4.E**) (Aliouat-Denis *et al.* 2008; Beck & Cushion 2009). No final, o quisto maduro é produzido, com uma estrutura morfológica esférica típica, de diâmetro compreendido entre 4 a 8  $\mu\text{m}$ , constituído normalmente por uma parede celular rígida, rica em  $\beta$ -glucanos, com camadas espessas, de aproximadamente 50 nm de espessura; uma camada externa mais electrodensa, uma camada intermédia electrolucente e uma interna menos densa, em contacto permanente com a membrana plasmática (Helweg-Larsen 2004; Wazir & Ansari 2004; Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009; Beck & Cushion 2009; Kaneshiro & Limper 2011). O citoplasma do quisto é constituído maioritariamente por mitocôndrias e ribossomas, onde um núcleo, nucléolo e retículo endoplasmático também são visualizados (**Figura 3.B**) (Souza & Benchimol 2005). No interior, é possível identificar oito corpos intraquísticos, cada um com dimensões entre 1 a 2  $\mu\text{m}$  (Helweg-Larsen 2004; Wazir & Ansari 2004; Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009). Os corpos intraquísticos, dependendo da estrutura quística formada, podem ser morfológicamente diferentes, desde esféricos, a forma de banana ou irregulares/amebóides (Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2009), sendo mononucleados, com um citoplasma denso e uma parede celular com uma camada electrodensa, revestida por uma membrana externa; apresentam mitocôndrias e retículo endoplasmático bem desenvolvidos e inúmeros ribossomas (Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis *et al.* 2008, 2009). Após maturação, os corpos intraquísticos irregulares ou em forma de banana, observados nos quistos de parede celular mais fina, sofrem divisões mitóticas, e os trofozoítos são formados no interior do quisto (processo denominado de endogenia) e só depois são libertados (**Figura 4.F**) (Kaneshiro & Limper 2011); os corpos intraquísticos esféricos observados

no interior de quistos de paredes espessas são libertados, por ruptura da parede quística, e dão origem a novos trofozoítos haplóides (**Figura 4.G**) (Helweg-Larsen 2004; Souza & Benchimol 2005; Thomas & Limper 2007; Aliouat-Denis *et al.* 2009; Beck & Cushion 2009).



**Figura 4.** Ilustração do ciclo de vida de *Pneumocystis* spp. **A.** Reprodução assexuada, por fissão binária ou endogenia; **B.** Reprodução sexuada, por conjugação. **C. D. E.** Etapas de formação do préquisto; **F. G.** Formação e libertação dos corpos intraquístico (adaptado de Kaneshiro & Limper 2011).

Os processos sequenciais descritos deste ciclo de vida complexo, compatíveis com processos visualizados em outros fungos ascomicotas, foram maioritariamente estudados pelos autores por observações microscópicas, devido, sobretudo, à problemática do crescimento de espécies de *Pneumocystis* em cultura (Thomas & Limper 2004, 2007).

#### 1.4. Importância clínica da PPc nos humanos

*P. jirovecii*, responsável por causar infecções oportunistas específicas no aparelho respiratório dos humanos (Morris *et al.* 2008), é a principal causa de pneumonia grave e por vezes fatal em indivíduos imunocomprometidos (Stringer *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004). Primeiramente foi associado a uma epidemia que surgiu entre 1930 e 1940 e que ocorria maioritariamente em crianças debilitadas de instituições e orfanatos Europeus (Hughes 2001; Kovacs *et al.* 2001; Stringer *et al.* 2002; Catherinot *et al.* 2010). O seu reconhecimento como agente etiológico da PPc foi comprovado por volta de 1951/52, através da associação encontrada entre a identificação do patógeno em tecido pulmonar pertencente a crianças, que apresentavam a patologia, na altura conhecida como pneumonia intersticial (Kovacs *et al.* 2001; Catherinot *et al.* 2010).

Até meados de 1980, a PPc era incomum e casos esporádicos eram descritos em crianças desnutridas e prematuras, que representavam cerca de 68% dos casos conhecidos (Catherinot *et al.* 2010); a PPc também era reportada em indivíduos imunocomprometidos, maioritariamente com síndromes de imunodeficiência, imunodeficiência congénita ou submetidos a terapia imunossupressora (Helweg-Larsen 2004; Morris *et al.* 2004); antes da implementação de quimioprofilaxia, doentes transplantados e com cancro, apresentavam taxas de PPc entre 5 a 25% e 1 a 25%, respectivamente (Morris *et al.* 2004).

Em 1980, com o advento do vírus da imunodeficiência humana (VIH)/ síndrome da imunodeficiência adquirida (sida), um importante problema mundial de saúde pública (Kaneshiro & Limper 2011), os casos de PPc aumentaram consideravelmente, atingindo uma taxa elevada de aproximadamente 20 000 casos por ano (Kovacs *et al.* 2001; Morris *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006), tornando-se na doença infecciosa mais comum definidora do estágio de sida (Helweg-Larsen 2004), uma vez que, em cerca de 2/3 dos seropositivos para VIH, esta compreendia a primeira infecção oportunista importante encontrada (Morris *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006). Estimava-se que mais de 75% dos indivíduos infectados por VIH acabariam por desenvolver a doença no decorrer de suas vidas (Morris *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006; Varela *et al.* 2011), sendo a causa de morte em cerca de 20 a 25% desses indivíduos (Varela *et al.* 2011). Consequentemente, a pandemia do VIH e a emergência da PPc, acabaram por despertar

o interesse na pesquisa e compreensão de *Pneumocystis* no meio científico (Calderón 2009; Kaneshiro & Limper 2011).

A incidência da PPc começou a diminuir, a partir de 1989, com a implementação de profilaxia anti-*Pneumocystis* (Kovacs *et al.* 2001; Helweg-Larsen 2004; Morris *et al.* 2004; Catherinot *et al.* 2010), principalmente para seropositivos para VIH e que apresentavam determinados critérios como contagem de células TCD4<sup>+</sup> abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> (Kovacs *et al.* 2001). Um declínio mais acentuado na sua incidência, e também na mortalidade, foi verificado no decorrer da década de 90 do século passado, devido à introdução da terapia anti-retrovírica combinada (HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*), no ano de 1996, para o tratamento de infecções por VIH (Stringer *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004; Calderón 2009; Catherinot *et al.* 2010). O decréscimo da taxa de PPc começou a ser significativo entre 1992 e 1995 com uma diminuição de 3,4% ao ano (Morris *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006), sendo o declínio mais acentuado após este período, entre 1996 e 1998, com uma diminuição de 21,5% ao ano (Morris *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006). Outros estudos constataram que a incidência passou de 4,9 casos por 100 habitantes/ano antes do fim do primeiro trimestre de 1995, para 0,3 casos por 100 habitantes/ano depois de Março de 1998 (Morris *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006).

Actualmente, a PPc ainda é uma das doenças oportunistas com maior morbimortalidade em indivíduos com imunodeficiências. Os infectados por VIH/sida ainda representam um dos grupos de risco mais afectados por esta patologia (Morris *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004; Catherinot *et al.* 2010; Matos & Esteves 2010a; Kaneshiro & Limper 2011). Dados da ECDC comprovam este facto, e indicam que esta doença continua a ser a principal infecção oportunista definidora do estágio de sida entre adolescentes e adultos (ECDC 2011).

A PPc continua a desenvolver-se, com elevada importância clínica, sobretudo nos indivíduos que não possuem uma resposta eficaz à HAART (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Catherinot *et al.* 2010; Matos & Esteves 2010a); em indivíduos sem acesso a profilaxia anti-PPc, ou sem acesso aos medicamentos anti-retrovirais, principalmente nos países em desenvolvimento (Morris *et al.* 2004; Matos & Esteves 2010a); em indivíduos não diagnosticados ou incompatíveis com o tratamento prescrito

para a PPc (Morris *et al.* 2002); em indivíduos imunocomprometidos por razões de transplantes de órgãos, quimioterapia para o cancro ou submetidos ao tratamento de doenças autoimunes e, mais recentemente, em grupos pouco imunocomprometidos como é o caso de indivíduos com doença pulmonar crónica, principalmente em países desenvolvidos (Stringer *et al.* 2002; Morris *et al.* 2004; Matos & Esteves 2010a; Kaneshiro & Limper 2011).

Apesar dos avanços progressivos efectuados nos últimos anos, a PPc continua a ser um grave problema clínico (Morris 2008; Walzer *et al.* 2008), sendo a prevenção um dos principais objectivos (Matos & Esteves 2010a). O seu prognóstico relacionado com eventuais factores de mortalidade da doença, não tem sofrido grandes alterações ao longo da sua história clínica. Factores como idade avançada, baixos níveis de hemoglobina, baixa pressão parcial de oxigénio (PaO<sub>2</sub>), necessidade de ventilação mecânica, pneumotórax, episódios anteriores da PPc e a presença de comorbidade médica, são ainda considerados indicadores de risco para a mortalidade, estando maioritariamente associados com mau prognóstico da PPc (Morris 2008; Walzer *et al.* 2008). Por outro lado, ainda não se sabe porque é que alguns indivíduos que apresentam casos moderados da PPc, possuem uma resposta favorável ao tratamento; enquanto em outros indivíduos, com casos consideravelmente mais graves, apesar da terapêutica instituída, a PPc é muitas vezes fatal (Walzer *et al.* 2008).

Estas e outras questões, envolvidas na problemática desta doença oportunista, têm sido, no decorrer dos últimos anos, analisadas e compreendidas através de abordagens clínicas e epidemiológicas, que têm facilitado o estudo da PPc (Walzer *et al.* 2008; Matos & Esteves 2010b).

## 1.5. Principais conceitos epidemiológicos da infecção por *P. jirovecii*

### 1.5.1. Modos de infecção

*Pneumocystis*, sendo um microrganismo oportunista, apresenta uma capacidade acrescida em estabelecer-se e iniciar a sua proliferação no aparelho respiratório de indivíduos com um sistema imunitário debilitado, sendo estes hospedeiros imunocomprometidos, os que possuem uma maior susceptibilidade para contrair a infecção (Stringer *et al.* 2002; Matos *et al.* 2006; Kaneshiro & Limper 2011).

O modo como os humanos adquirem a infecção não está muito bem esclarecido, vários dados e observações corroboram algumas hipóteses, sendo a teoria da reactivação de uma infecção latente e a teoria da reinfeção, as mais plausíveis até à data (Morris *et al.* 2002; Kaneshiro & Limper 2011). A teoria sobre a reactivação de uma infecção latente, uma das primeiras hipóteses a ser considerada, propõe que a exposição de um indivíduo à *P. jirovecii* ocorre na infância, logo nos primeiros meses de vida, e apesar de nesta fase o sistema imunitário ser capaz de controlar esta infecção primária assintomática, *P. jirovecii* permanece latente até ter a possibilidade de proliferar e causar pneumonia, o que normalmente ocorre com uma supressão do sistema imunitário (Beard & Navin 1996; Morris *et al.* 2002; Wakefield 2002; Miller & Huang 2004). Já a teoria de reinfeção, mais recente e fortemente sustentada, sugere que existe uma exposição quase permanente, durante toda a vida, entre indivíduos e possíveis fontes de infecção, supondo que as reinfeções poderão ocorrer, através de reservatórios ambientais ou directamente entre humanos (Keely & Stringer 1997; Morris *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004; Kaneshiro & Limper 2011).

A primeira teoria enunciada pode ser defendida através de estudos serológicos que confirmam que a maioria das crianças consideradas saudáveis, apresentam anticorpos anti-*Pneumocystis* (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002; Helweg-Larsen 2004; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005; Peterson & Cushion 2005), e que a prevalência desses anticorpos específicos parece aumentar com a idade (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004; Medrano *et al.* 2005; Peterson & Cushion 2005). Alguns estudos também verificaram a existência de *P. jirovecii* em amostras biológicas respiratórias de indivíduos imunocompetentes, sem evidência clínica da PPC, apoiando que o parasita poderá então permanecer no

hospedeiro, de uma forma controlada, por tempo indeterminado (Morris *et al.* 2002; Wakefield 2002). No entanto, muitos outros estudos não conseguiram obter resultados semelhantes, o que por outro lado pode evidenciar que o patógeno é eliminado antes de poder causar infecção (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005).

Com o advento da biologia molecular, novos estudos genéticos foram sendo realizados, permitindo adquirir novas informações que apoiam a já referida teoria de reinfeção (Morris *et al.* 2002; Matos & Esteves 2010b). As primeiras evidências foram efectuadas a partir de estudos com seropositivos para VIH, onde foi possível a identificação de genótipos distintos de *P. jirovecii*, num mesmo indivíduo, em casos recorrentes da PPc (Beard & Navin 1996; Keely & Stringer 1997; Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005; Peterson & Cushion 2005; Matos & Esteves 2010b; Wissmann *et al.* 2010). Estes dados sugerem que cada genótipo encontrado representa uma nova infecção por *P. jirovecii* e que esta ocorre próxima ao surgimento dos sintomas da doença (Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002). Outros estudos epidemiológicos constataram que existe uma grande variabilidade de frequências genotípicas, em isolados de *P. jirovecii*, consoante a distribuição geográfica da doença, e que esta variação pode reflectir o local da origem de infecção, que muito provavelmente está associada ao local de residência e não ao local de nascimento do indivíduo, supondo que a infecção foi adquirida recentemente (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002; Miller & Huang 2004; Matos & Esteves 2010b; Wissmann *et al.* 2010).

Assim, sugere-se que, apesar da reactivação de uma infecção latente ser uma possibilidade, não é o único mecanismo para o estabelecimento da infecção (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Matos & Esteves 2010b). Enquanto a infecção primária parece ser muito comum durante a infância (Stringer *et al.* 2002; Wakefield 2002), a suposta infecção latente nos adultos é um processo muito limitado (Beard & Navin 1996; Stringer *et al.* 2002; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005), podendo em alguns indivíduos ser transitório, estando estes sujeitos a novas reinfeções (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002).

### 1.5.2. Transmissão e possíveis reservatórios

Sabe-se que a transmissão de *Pneumocystis*, por se tratar de um fungo ubíquo, deverá ser efectuada maioritariamente por via aérea, onde os hospedeiros humanos e outros mamíferos poderão estar constantemente expostos a este microrganismo (Morris *et al.* 2002; Kaneshiro & Limper 2011). A transmissão por esta via já foi demonstrada em estudos com modelos animais, onde verificaram que a exposição ao ar contaminado pode ser muito importante para o desenvolvimento da doença e que a transmissão entre hospedeiros animais da mesma espécie ocorre frequentemente (Hughes 1982; Powles *et al.* 1992; Ceré *et al.* 1997; An *et al.* 2003). Contudo, a transmissão por via aérea entre humanos ainda não foi confirmada (Hughes 2001; Matos & Esteves 2010b). A detecção e identificação de genótipos de *P. jirovecii* em ambiente hospitalar, particularmente em amostras recolhidas em filtros de ar, em locais com doentes infectados, suportam este tipo de transmissão em humanos (Olsson *et al.* 1998; Matos & Esteves 2010b). Em alguns estudos, o genótipo encontrado no ar envolvente era idêntico ao identificado nas amostras biológicas dos doentes, indicando que a presença de DNA de *P. jirovecii* no ar hospitalar, poderá estar correlacionado com a sua eventual aquisição (Olsson *et al.* 1998).

Acredita-se que a transmissão em humanos é antroponótica, excluindo a partida reservatórios animais (Wakefield 2002; Aliouat-Denis *et al.* 2008). No entanto, pela detecção de DNA de *Pneumocystis* no ambiente, possíveis reservatórios naturais não podem ser excluídos (Catherinot *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011). Wakefield (1996), ao detectar sequências de DNA de espécies de *Pneumocystis* em amostras de ar, não apenas refere que este patógeno poderá ser muito comum no ambiente, mas também sugere que a forma morfológica nesta suposta fase ambiental poderá ser diferente das formas normalmente encontradas nos pulmões. *Pneumocystis* poderá então sobreviver no ambiente, de uma forma latente, por meio de esporos, por um mecanismo independente dos seus hospedeiros (Wakefield 1996; Helweg-Larsen 2004; Thomas & Limper 2007; Kaneshiro & Limper 2011). Outros estudos, associando um maior risco de infecção entre indivíduos que estão constantemente em contacto com o solo, sugerem que *Pneumocystis* também poderá ser transmitido a partir do solo como acontece com outras infecções fúngicas (Helweg-Larsen 2004).

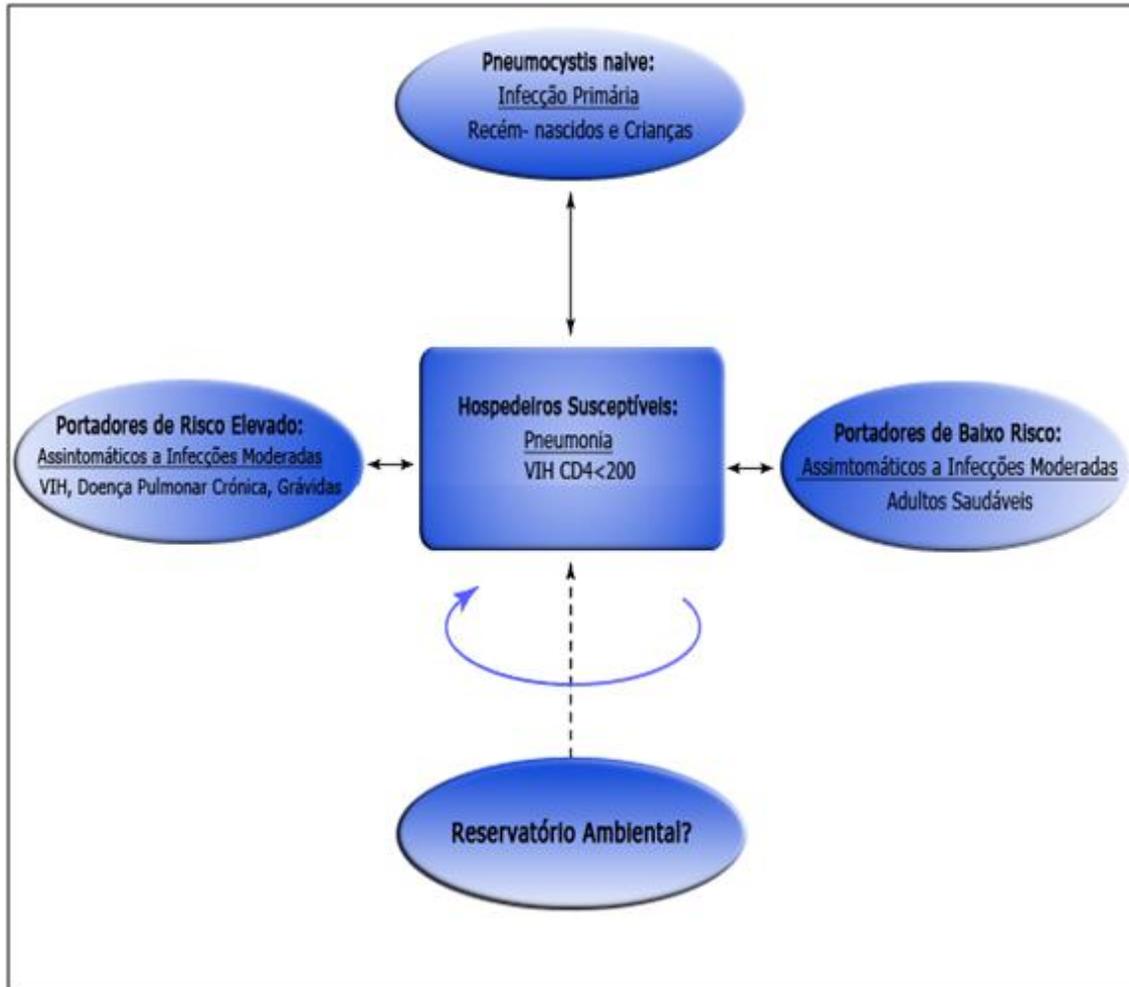
Reservatórios humanos também têm sido considerados. *P. jirovecii* está a ser estudado como um dos agentes de infecção em contacto, mais frequente, com os seus hospedeiros (Varela *et al.* 2011). A suposta colonização de *P. jirovecii* na população humana, em geral, está a ter grandes repercussões, e esta nova percepção poderá ser um dos aspectos mais importantes para o mecanismo de transmissão (Huang *et al.* 2006; Catherinot *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011).

A provável importância da população humana passou a ser verificada com o desenvolvimento de técnicas de detecção e amplificação de DNA mais sensíveis, que permitiram proceder à identificação de *P. jirovecii* em amostras biológicas respiratórias de indivíduos assintomáticos, imunocomprometidos com vários níveis de imunossupressão e imunocompetentes, com uma carga parasitária muito reduzida, provavelmente não detectável com os métodos de diagnóstico de rotina (Matos *et al.* 2001; Miller & Huang 2004; Medrano *et al.* 2005; Peterson & Cushion 2005; Matos *et al.* 2006; Ponce *et al.* 2010; Wissmann *et al.* 2010). Evidenciando que a exposição de *P. jirovecii* em humanos também poderá ser caracterizada por uma colonização intermitente (Morris *et al.* 2002).

A determinação desta suposta colonização está a ser verificada em vários grupos de estudo, sendo possível que a circulação de *P. jirovecii* poderá estar relacionada com diversas sub-populações (**Figura 5**) (Peterson & Cushion 2005; Matos & Esteves 2010b; Wissmann *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011). Primeiramente, verificou-se que a população de indivíduos infectados por VIH representa um dos grupos com uma elevada frequência de colonização por parte de *P. jirovecii*, sendo que a prevalência desta colonização, neste grupo, poderá indicar um potencial foco importante desta patologia para outros indivíduos susceptíveis (Matos *et al.* 2001; Calderón 2009; Catherinot *et al.* 2010; Wissmann *et al.* 2010). A constatação de que os profissionais de saúde, em contacto com doentes com PPC, podem ser outro grupo de estudo importante, mostrou que o risco de serem potenciais portadores da infecção é superior em relação aos profissionais que não estão constantemente expostos (Lundgren *et al.* 1997; Vargas *et al.* 2000). Este grupo pode ser importante numa provável transmissão nosocomial de *P. jirovecii*, uma vez que os profissionais podem ser potenciais transmissores da infecção para indivíduos susceptíveis em ambiente hospitalar (Catherinot *et al.* 2010; Wissmann *et al.* 2010). A colonização frequente, por *P. jirovecii*, em grupos de

indivíduos ligeiramente imunossuprimidos, também foi determinada por Maskell *et al.* (2003), sendo a frequência de detecção de *P. jirovecii* nas amostras biológicas muito superior à esperada, podendo estes indivíduos estarem envolvidos no ciclo de transmissão. Outros estudos também obtiveram resultados semelhantes, em doentes com diferentes patologias pulmonares, sugerindo que estes indivíduos podem ser potenciais portadores transitórios de *P. jirovecii* (Sing *et al.* 1999; Matos *et al.* 2006), e que os danos tecidulares encontrados nos pulmões podem favorecer a colonização por parte deste patógeno (Sing *et al.* 1999). Outras evidências sugerem que as grávidas também podem representar um reservatório da infecção e devem possuir um papel crucial na transmissão para os seus recém-nascidos (Miller *et al.* 2002; Vargas *et al.* 2003). A identificação de genótipos idênticos entre a mãe e a respectiva criança, são dados que apoiam esta hipótese (Miller *et al.* 2002). Outro estudo refere uma provável transmissão vertical, sugerindo que o estado imunitário da mulher, durante a gravidez, pode favorecer a transmissão de *P. jirovecii* para o feto (Montes-Cano *et al.* 2009); Estudos mais recentes referem que também os indivíduos imunocompetentes podem ser reservatórios de *P. jirovecii*. A constatação de que colonizações pulmonares por *P. jirovecii* são comuns e frequentes nestes indivíduos, indicam que este grupo, de portadores temporários, pode possuir um papel crucial e activo na transmissão, já que vão sendo reinfectedados por este microrganismo ao longo da vida (Medrano *et al.* 2005; Ponce *et al.* 2010).

A implicação da ocorrência de transmissão inter-humana na população em geral, bem como a elevada incidência de grupos de indivíduos portadores assintomáticos, pode ser um importante problema de saúde pública (Morris *et al.* 2002; Stringer *et al.* 2002; Medrano *et al.* 2005; Matos *et al.* 2006). Deste modo, estudos mais abrangentes deverão ser efectuados e a determinação da prevalência de colonização, bem como outros dados epidemiológicos deverão ser esclarecidos (Wissmann *et al.* 2010).



**Figura 5.** Representação esquemática das prováveis vias de exposições em indivíduos susceptíveis de desenvolver a PPC: Em cada grupo de indivíduos (texto a negrito) é descrito as prováveis manifestações da infecção (texto sublinhado) seguido de alguns exemplos de possíveis populações de risco. A seta descontinua representa a incerteza da via de exposição por uma fonte ambiental. A seta a azul representa a transmissão directa que provavelmente ocorre entre um indivíduo com PPC para outro indivíduo susceptível (adaptado e modificado de Peterson & Cushion 2005).

## 1.6. Apresentação e diagnóstico da PPc

### 1.6.1. Critérios clínicos

A apresentação e a evolução clínica da PPc podem variar consoante a condição de imunossupressão do indivíduo (Huang *et al.* 2006; Fujii *et al.* 2007). Dentro dos grupos de risco definidos, destacam-se os indivíduos seropositivos para VIH que frequentemente manifestam a doença quando o nível de contagem de células TCD4<sup>+</sup> é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup> (Thomas & Limper 2004; Huang *et al.* 2006; Catherinot *et al.* 2010). Nestes indivíduos a doença é caracterizada por ser subaguda, com uma apresentação tardia, 25 a 28 dias pós infecção, diferindo da apresentação encontrada em indivíduos seronegativos para VIH, com outros tipos de imunodeficiências, onde a sintomatologia surge de forma súbita (Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Castro & Morrison-Bryant 2010; Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011; Varela *et al.* 2011).

Existe um grande número de sintomas relacionados com a PPc, sendo o quadro clínico da infecção muito variável (Varela *et al.* 2011). Os sintomas mais comuns, frequentemente encontrados, são dispneia progressiva, tosse não produtiva e febre (Munksgaard 2004; Thomas & Limper 2004; Huang *et al.* 2006; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011; Varela *et al.* 2011). Outros sintomas podem desenvolver-se como tosse produtiva, dor no peito, e simples sintomas de gripe (Munksgaard 2004; Thomas & Limper 2004; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011). Em certos casos os indivíduos podem ser assintomáticos ou podem apresentar uma insuficiência respiratória fulminante (Fujii *et al.* 2007).

O exame físico normalmente é inespecífico. A auscultação pulmonar muitas vezes revela-se normal (Huang *et al.* 2006; Fujii *et al.* 2007). Taquipnéia, taquicardia e/ou cianose também podem ser observados (Thomas & Limper 2004; Wazir & Ansari 2004; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Castro & Morrison-Bryant 2010; Catherinot *et al.* 2010; Varela *et al.* 2011). A radiografia pulmonar normalmente é caracterizada por um infiltrado bilateral intersticial que predomina na região peri-hilar, e torna-se mais homogéneo e difuso com a progressão da doença (Thomas & Limper 2004; Wazir & Ansari 2004; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Castro & Morrison-Bryant 2010; Varela *et al.* 2011). As apresentações radiológicas podem variar, e outras

alterações também podem ser observadas, como infiltrados unilaterais, nódulos, lesões cavitárias, ou císticas, e pneumotorax (Thomas & Limper 2004; Wazir & Ansari 2004; Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Castro & Morrison-Bryant 2010; Huang *et al.* 2011). No entanto, em alguns casos, uma tomografia computadorizada de alta resolução (do inglês *High-Resolution Computed Tomography*), devido a sua grande sensibilidade, pode ser útil principalmente quando a radiografia do torax é normal, ou sem alterações, na altura do diagnóstico clínico (Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Castro & Morrison-Bryant 2010; Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011; Varela *et al.* 2011).

Não obstante, alterações bioquímicas, hematológicas e serológicas também são identificadas em indivíduos com suspeita clínica de PPc, contudo estas variações anormais não são geralmente específicas da infecção. Normalmente, marcadores laboratoriais não específicos, como o aumento dos níveis de desidrogenase láctica (do inglês *lactate dehydrogenase*) e baixa PaO<sub>2</sub>, que conduz a hipoxia, são frequentemente encontrados em indivíduos com PPc (Fujii *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010).

A disseminação da infecção pode ocorrer através do sistema linfático e sanguíneo, espalhando-se para órgãos extrapulmonares, particularmente, tireóide, fígado, medula óssea, gânglios linfáticos, baço e rins, mas já foi identificado em outros órgãos (Wazir & Ansari 2004; Fujii *et al.* 2007; Varela *et al.* 2011). Estas raras manifestações são principalmente reportadas em casos específicos de indivíduos infectados por VIH (Munksgaard 2004; Fujii *et al.* 2007).

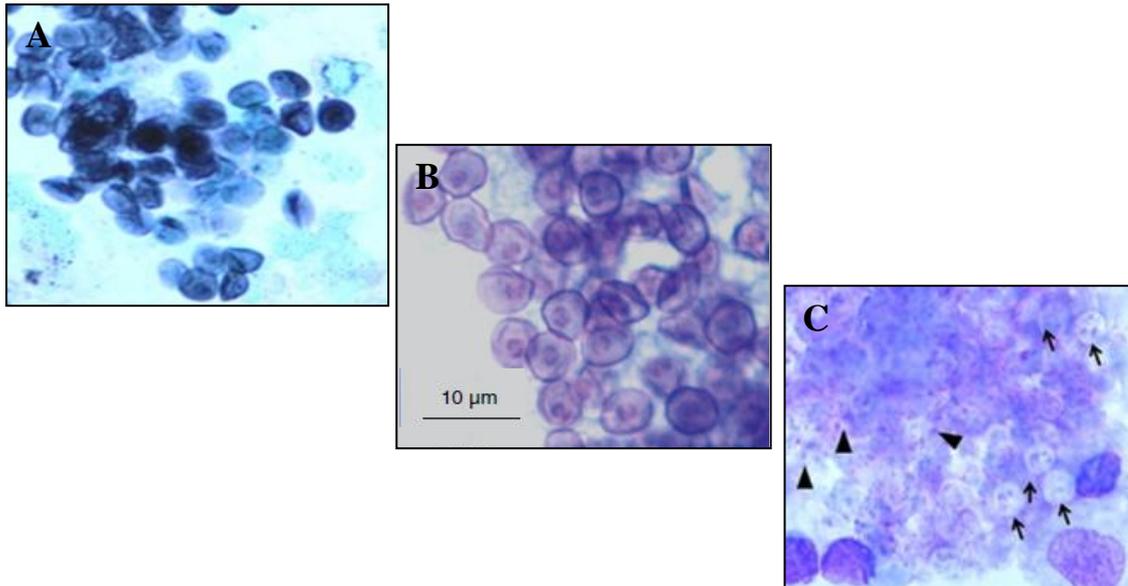
Independentemente do caso encontrado, um conhecimento adequado sobre as características clínicas apresentadas são factores importantes a ter em conta (Fujii *et al.* 2007; Varela *et al.* 2011) e, apesar de não existir uma abordagem universal em indivíduos com suspeita clínica de PPc, na maioria dos casos, o diagnóstico definitivo é muito importante para a confirmação precoce da doença e instituição da terapêutica adequada (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2011).

### 1.6.2. Detecção microscópica de *P. jirovecii*

No decorrer dos últimos anos melhorias no diagnóstico laboratorial têm sido implementadas (Kovacs *et al.* 2001), mas devido a incapacidade de crescimento de *P. jirovecii* em cultura (Jarboui *et al.* 2009), o método *standard* de diagnóstico laboratorial continua a ser baseado principalmente na observação microscópica, a partir de amostras biológicas respiratórias, preferencialmente lavado broncoalveolar (LBA) e expectoração induzida (EI) (Helweg-Larsen 2004; Durand-Joly *et al.* 2005; Fujisawa *et al.* 2009; Huang *et al.* 2011).

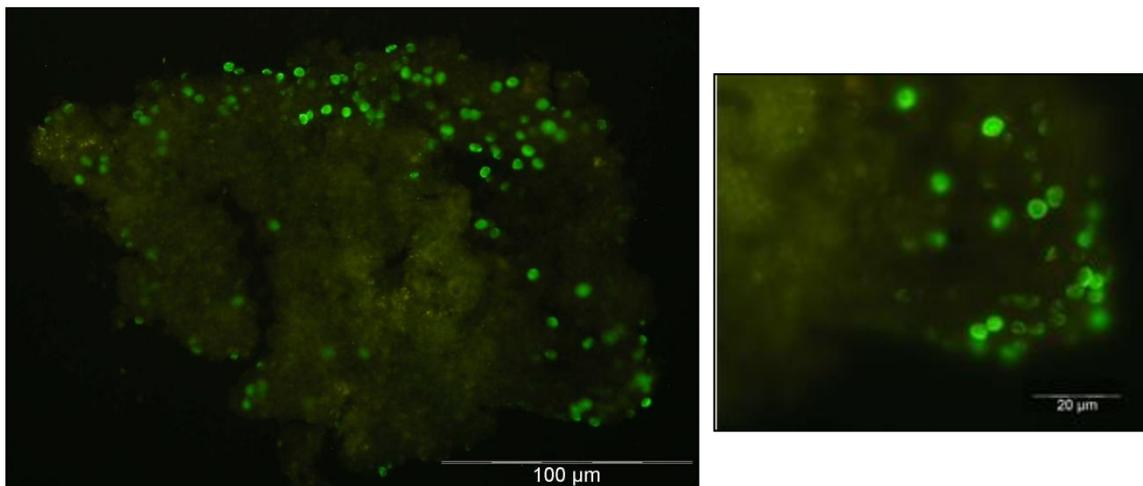
A identificação microscópica de *P. jirovecii* pode ser efectuada através de várias técnicas de colorações convencionais, como a coloração pela metenamina prata (GMS – *Gomori Methenamine-Silver*), a coloração pelo giemsa e a coloração de azul de toluidina (TBO – *Toluidine-Blue O*), comumente utilizadas para a identificação de formas morfológicas características do ciclo de vida (Gill *et al.* 1987; Lautenschlager *et al.* 1996; Kovacs *et al.* 2001; Durand-Joly *et al.* 2005; Calderón *et al.* 2010). A coloração GMS (**Figura 6.A**) e TBO (**Figura 6.B**) são mais específicas para as formas quísticas, ao possuírem uma grande afinidade para os constituintes da parede; já a coloração giemsa (**Figura 6.C**) é mais específica para a visualização de trofozoítos, ou corpos intraquísticos no interior dos quistos (Hughes 2001; Kovacs *et al.* 2001; Calderón *et al.* 2010; Catherinot *et al.* 2010).

A subjectividade encontrada neste tipo de técnicas reflecte a sua inespecificidade, sobretudo pela grande variedade de estruturas morfológicas que poderão ser encontradas, semelhantes as formas de *Pneumocystis* (Gill *et al.* 1987; Elvin *et al.* 1988; Lautenschlager *et al.* 1996; Ribes *et al.* 1997). A eficácia e sensibilidade destas técnicas também podem variar consideravelmente, tendo em conta vários parâmetros, dependendo sobretudo, da experiência do técnico, do tipo de amostra biológica a utilizar e da quantidade de microrganismos presentes na amostra (Ribes *et al.* 1997; Flori *et al.* 2004; Helweg-Larsen 2004; Calderón *et al.* 2010).



**Figura 6.** Detecção microscópica de formas morfológicas de *Pneumocystis* em LBA: **A:** Visualização de quistos corados com GMS (ampliação 500X); **B:** Visualização de quistos corados com TBO; **C:** Visualização de trofozoítos (▲) e corpos intraquísticos (↑) no interior de quistos corados com giemsa (ampliação 500X) (adaptado e modificado de Calderón *et al.* 2010 e Catherinot *et al.* 2010).

Em 1986 com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais (AcM) específicos para *P. jirovecii*, técnicas de imunofluorescência, directa e indirecta (IFI), começaram a ser implementadas no diagnóstico da PPc (Kovacs *et al.* 2001), e demonstraram ser mais específicas e sensíveis na identificação do microrganismo, em comparação com as colorações de microscopia convencionais (Olsson *et al.* 1993; Lautenschlager *et al.* 1996; Ribes *et al.* 1997). A especificidade deste tipo de técnicas aumenta quando dirigida para a detecção de antigénios (Ag) existentes na parede quística do microrganismo, apenas expostos à superfície por digestão enzimática (Lautenschlager *et al.* 1996). Considerada actualmente, como método de referência, a imunofluorescência com AcM é correntemente utilizada em laboratórios de diagnóstico, sobretudo devido a facilidade de manutenção e detecção mais rápida e fácil do parasita (Olsson *et al.* 1993; Gill *et al.* 1987; Elvin *et al.* 1988; Jarboui *et al.* 2009).



**Figura 7.** Detecção microscópica de quistos de *P. jirovecii* em LBA por IFI com AcM (fotografias da autora).

### 1.6.3. Detecção molecular de *P. jirovecii*

Métodos moleculares para a detecção de DNA de *Pneumocystis* foram primeiramente abordados em 1990 e, posteriormente, muitos investigadores analisaram a técnica de PCR como uma possível aplicação para o estudo da PPc (Hughes 2001; Kovacs *et al.* 2001). Consequentemente, nos últimos 20 anos, vários métodos baseados na PCR têm sido desenvolvidos, tendo como alvo uma grande variedade de genes (Kovacs *et al.* 2001; Calderón *et al.* 2010).

Cedo verificou-se que este tipo de técnicas possuíam uma elevada sensibilidade e reprodutibilidade para o diagnóstico da PPc (Torres *et al.* 2000; Flori *et al.* 2004), sendo possível uma maior facilidade na amplificação e detecção de DNA de *P. jirovecii*, em diversos tipos de amostras biológicas pulmonares (Barry & Johnson 2001; Kovacs *et al.* 2001; Jarboui *et al.* 2009; Calderón *et al.* 2010; Kaneshiro & Limper 2011).

A *nested-PCR* é uma das técnicas convencionais da PCR que tem sido otimizada para o diagnóstico da PPc (Kovacs *et al.* 2001). Este método, ao possuir dois processos consecutivos de amplificação, torna-se muito sensível e a sua sensibilidade aumenta quando é direccionada para amplificar genes de múltipla cópia, como é o caso dos genes mitocondriais (Barry & Johnson 2001; Kovacs *et al.* 2001; Jarboui *et al.* 2009). Deste modo, a detecção de DNA de *P. jirovecii* pode ser garantida em amostras biológicas não invasivas, e/ou com carga parasitária reduzida (Jarboui *et al.* 2009;

Calderón *et al.* 2010). Contudo, a detecção de *P. jirovecii* pelas técnicas de PCR, em indivíduos com microscopia negativa, já foi constatada em vários estudos, e evidencia que um resultado de PCR positivo pode ser apresentado mesmo em indivíduos que não possuem uma infecção activa (Kovacs *et al.* 2001; Calderón *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011). É importante referir que casos clínicos podem ser facilmente diagnosticados através da PCR mas a facilidade de detectar casos assintomáticos ou subclínicos é muito elevado, o que dificulta a interpretação do resultado obtido laboratorialmente (Jarboui *et al.* 2009; Calderón *et al.* 2010).

As limitações do diagnóstico molecular podem ser resolvidas pela utilização de técnicas mais apropriadas como a PCR em tempo real (do inglês *Real-Time PCR*), sendo mais promissora uma vez que, pela quantificação do DNA amplificado, poderá ser possível distinguir entre portadores assintomáticos e casos clínicos (Torres *et al.* 2000; Flori *et al.* 2004; Fujisawa *et al.* 2009; Calderón *et al.* 2010). Porém, as técnicas de PCR, actualmente, são mais utilizadas na investigação e como métodos complementares de diagnóstico da PPc (Torres *et al.* 2000; Jarboui *et al.* 2009).

## 1.7. Tratamento e profilaxia da PPc

Antes da existência de uma terapêutica específica para a PPc, o prognóstico global dos indivíduos infectados por *P. jirovecii* era considerado pobre (Hughes 2001). No início da epidemia do VIH a taxa de mortalidade rondava os 30 a 40%, podendo a percentagem de mortes ser superior, principalmente, em indivíduos que apresentavam insuficiências respiratórias (Helweg-Larsen 2004).

Actualmente a implementação do tratamento precoce é essencial, sobretudo devido à rápida progressão da doença e ao, ainda, significativo índice de mortalidade observado (Helweg-Larsen 2004; Varela *et al.* 2011). A constatação da severidade da doença e a identificação do caso de PPc – leve, moderado ou grave – acaba por ser importante e decisivo para as medidas a desenvolver na altura do tratamento, como o tipo de medicamento a utilizar, a necessidade de suporte respiratório, ou outras intervenções durante o processo terapêutico em meio hospitalar (Castro & Morrison-Bryant 2010; Varela *et al.* 2011).

Em 1978, estudos confirmaram uma eventual eficiência da terapêutica com fármacos combinados para o tratamento da PPc (Hughes 2001; Helweg-Larsen 2004). Desde então, trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMZ) é a combinação de fármacos de primeira linha aconselhada para a maioria dos casos, quer em seropositivos para VIH, quer imunodeficientes seronegativos para VIH (Huang *et al.* 2006; Castro & Morrison-Bryant 2010; Catherinot *et al.* 2010; Matos & Esteves 2010a; Varela *et al.* 2011).

TMP-SMZ é constituído por dois agentes antimicrobianos, trimetoprim (TMP) e sulfametoxazol (SMZ), que demonstraram ser altamente eficazes quando combinados (Castro & Morrison-Bryant 2010). Possuem um largo espectro de acção, inibindo um grande número de microrganismos (Munksgaard 2004). Esta terapia actua sobre a síntese de ácido fólico, impedindo a biossíntese sequencial deste ácido, provocando efeitos nefastos no patogéneo (Castro & Morrison-Bryant 2010; Kaneshiro & Limper 2011; Varela *et al.* 2011). A disponibilidade de terapia oral e intravenosa facilitou a sua instituição e permite o tratamento específico de indivíduos que apresentam casos leves, moderados ou graves de PPc (Catherinot *et al.* 2010; Huang *et al.* 2011; Matos *et al.* 2011). TMP-SMZ é normalmente bem tolerado, com rápida e boa resposta clínica em mais de 80% dos indivíduos (Castro & Morrison-Bryant 2010; Kaneshiro & Limper

2011; Varela *et al.* 2011). Em contrapartida, reacções adversas são verificadas em 6 a 8% dos imunocomprometidos seronegativos para VIH, sendo esta percentagem mais elevada nos seropositivos para VIH, com uma taxa de 25 a 50% (Castro & Morrison-Bryant 2010). Ineficiência na terapêutica com TMP-SMZ ocorre em até 20% dos casos (Castro & Morrison-Bryant 2010).

Normalmente, a duração do tratamento chega a ser de 14 dias em imunocomprometidos, seronegativos para VIH, e de 21 dias para os seropositivos para VIH. A resposta à terapêutica inicia-se por volta dos primeiros oito dias de tratamento em seropositivos para VIH, sendo a resposta mais rápida, constatada no quarto/quinto dia de tratamento nos outros grupos de risco (Castro & Morrison-Bryant 2010; Varela *et al.* 2011). A terapia em determinados casos poderá ser prolongada, sendo normalmente necessária nos seropositivos para VIH, devido à elevada quantidade de carga parasitária e a uma resposta tardia do tratamento (Castro & Morrison-Bryant 2010).

Alternativas à terapêutica de primeira linha existem e incluem fármacos como pentamidina, primaquina-clindamicina, dapsona-trimetropim e atovaquona (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2011; Kaneshiro & Limper 2011; Matos *et al.* 2011). Pentamidina é um dos fármacos mais estudados, tendo sido utilizado no tratamento da PPC antes da epidemia VIH/sida (Castro & Morrison-Bryant 2010). É considerado igualmente eficiente quando comparado ao TMP-SMZ, contudo o facto de ser muito menos tolerável e de possuir uma grande ocorrência de reacções adversas, limita a sua utilização (Huang *et al.* 2006; Catherinot *et al.* 2010). A escolha preferencial para o fármaco de segunda linha acaba por ser limitada (Beck & Cushion 2009; Varela *et al.* 2011), muitas vezes devido à falta de eficácia e à toxicidade apresentadas nestes fármacos que, normalmente, é superior à encontrada na terapia com TMP-SMZ (Helweg-Larsen 2004; Beck & Cushion 2009).

Em termos profilácticos, TMP-SMZ continua a ser a medida aplicada para a prevenção deste organismo oportunista (Huang *et al.* 2006; Castro & Morrison-Bryant 2010; Matos & Esteves 2010a; Matos *et al.* 2011), principalmente, devido à sua grande eficácia, baixo custo e largo espectro antimicrobiano (Varela *et al.* 2011). Medidas alternativas profilácticas são recomendadas quando os indivíduos não são tolerantes a prevenção com TMP-SMZ (Munksgaard 2004). Dapsona, pentamidina, atovaquona,

primaquina são alguns dos agentes profiláticos considerados de segunda linha (Barry & Johnson 2001; Munksgaard 2004; Matos & Esteves 2010a; Huang *et al.* 2011).

A profilaxia é fundamental para os principais grupos de risco, uma vez que a PPc é considerada uma infecção grave e representativa de uma alta taxa de mortalidade (Catherinot *et al.* 2010). O nível de contagem de células TCD4<sup>+</sup> continua a ser um dos principais factores de risco a considerar, principalmente em indivíduos infectados por VIH, cuja probabilidade de manifestação da PPc aumenta consideravelmente quando o nível destas células é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup> (Barry & Johnson 2001; Huang *et al.* 2006; Castro & Morrison-Bryant 2010; Huang *et al.* 2011; Matos *et al.* 2011). Candidíase orofaríngea também é um indicador para a implementação de medidas profiláticas em seropositivos para VIH, independentemente da contagem de células TCD4<sup>+</sup> (Huang *et al.* 2006; Castro & Morrison-Bryant 2010; Huang *et al.* 2011). Outros grupos de risco incluem, imunossuprimidos, como indivíduos transplantados, hematológicos, ou submetidos a quimioterapia, sendo a profilaxia recomendada, uma vez que em determinada fase da imunossupressão, estes indivíduos encontram-se mais susceptíveis de contrair a infecção por *P. jirovecii* (Hughes 2001; Munksgaard 2004; Huang *et al.* 2006; Castro & Morrison-Bryant 2010). A profilaxia também é recomendada para seropositivos para VIH que tiveram um episódio recente de PPc, uma vez que a taxa de recidivas é de 50%, em poucos meses após o tratamento (Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2006; Huang *et al.* 2011; Varela *et al.* 2011).

A intervenção profiláctica, uma vez iniciada, é recomendada para o resto da vida (Matos & Esteves 2010a). Em determinados casos pode ser interrompida, se o factor de risco relacionado com a aquisição da PPc for minimizado (Huang *et al.* 2006; Huang *et al.* 2011). Com a introdução da HAART, a profilaxia para a PPc tem vindo a ser suspensa em indivíduos que apresentam uma resposta favorável a esta terapia e que por isso apresentam um nível de contagem de células TCD4<sup>+</sup> superior a 200 células/mm<sup>3</sup> (Barry & Johnson 2001; Hughes 2001; Helweg-Larsen 2004; Huang *et al.* 2006).

## 1.8. Heterogeneidade intra-específica em *P. jirovecii*

### 1.8.1. Caracterização molecular

Organismos que pertencem a uma mesma espécie, apesar de partilharem a maioria das características genómicas, propriedades bioquímicas e factores de virulência (quando patogénicos), podem apresentar um certo nível de variação intra-específica, que permite caracteriza-los em determinada estirpe ou subtipo específico (Olive & Bean 1999). Variabilidade intra-específica tem sido igualmente observada em microrganismos da espécie *P. jirovecii* (Lee *et al.* 1993) e, actualmente, a sua caracterização tem sido facilitada pelo crescente desenvolvimento de metodologias moleculares, sobretudo devido ao insucesso alcançado pela tipificação por métodos convencionais padronizados, baseados em reacções bioquímicas ou perfis antigénicos, devido à incapacidade e dificuldade na obtenção de isolados puros em cultura (Tsolaki *et al.* 1998; Wakefield 1998a; Lu & Lee 2008).

A caracterização em termos moleculares tem como base a análise de variação de sequências de DNA, principalmente em regiões genómicas com grande poder polimórfico e/ou com grande importância codificante (Esteves *et al.* 2010b). A heterogeneidade encontrada em sequências nucleotídicas, entre o genoma de distintos isolados de *P. jirovecii*, foi uma das primeiras considerações para a existência de diferentes subtipos ou estirpes (Lee *et al.* 1993). A existência de sequências polimórficas evidencia que a base da variabilidade de *P. jirovecii* está maioritariamente relacionada com variações pontuais, como os polimorfismos de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) (Esteves *et al.* 2011), sugerindo a presença de um grande número de subtipos genéticos (Stringer *et al.* 2002). A caracterização de *P. jirovecii* é principalmente assegurada por métodos de tipificação molecular (Beard *et al.* 2004), sendo a abordagem genética maioritariamente efectuada, pela análise de sequenciação directa, análise de fragmentos de restrição, análise de polimorfismos por comparação de DNA em cadeia simples e análise de sequências por hibridação com sondas específicas de oligonucleótidos (Lu *et al.* 1995; Hauser *et al.* 1997, 1998, 2001a; Beard *et al.* 2004; Ripamonti *et al.* 2009).

A utilidade da tipificação genética tem permitido a análise alargada de diferentes regiões genómicas, que podem ser consideradas como potenciais ferramentas

moleculares para o estudo desta espécie (Beard *et al.* 2000). Diferentes variações nucleotídicas têm sido encontradas num grande número de *loci* genéticos (Helweg-Larsen 2004), como é o caso dos genes nucleares de rRNA, que codificam as subunidades 5.8S e 26S, e a região ITS; genes mitocondriais como citocromo b (CYB – *cytochrome b*) ou os que codificam mtSSU rRNA e mtLSU rRNA; o gene  $\beta$ -TUB; o gene da família das glicoproteínas major de superfície (do inglês *major surface glycoprotein*); bem como genes que codificam enzimas como superóxido dismutase (SOD – *superoxide dismutase*), TS, *arom*, *tiorredoxina reductase*, DHFR e *dihidropteroato sintetase* (DHPS) (Stringer & Walzer 1996; Latouche *et al.* 1997; Hauser *et al.* 1998; Tsolaki *et al.* 1998; Beard *et al.* 2000, 2004; Stringer *et al.* 2002; Helweg-Larsen 2004; Ripamonti *et al.* 2009; Esteves *et al.* 2010b; Matos & Esteves 2010b).

A análise genética de determinado *locus*, quando aplicada de forma integrada, para além de contribuir para o entendimento sobre a biologia molecular e genética populacional deste patógeno, permite uma melhor percepção de determinadas propriedades relacionadas com a epidemiologia da infecção (Esteves *et al.* 2010b). De facto, a importância da caracterização molecular tem sido principalmente reconhecida ao nível epidemiológico (Olive & Bean 1999) e, em *P. jirovecii*, a tipificação de um determinado isolado, pode auxiliar sobretudo na detecção de possíveis fontes de infecção, verificação de prováveis vias de transmissão, e identificação de estirpes com diferentes propriedades patogénicas (Lamaignere *et al.* 2003).

### **1.8.2. Genotipagem de *P. jirovecii* e possível relação com parâmetros epidemiológicos**

A possibilidade de encontrar prováveis associações entre genótipos e alguns parâmetros clínicos e demográficos no contexto da infecção por *P. jirovecii* tem sido largamente estudada através da análise de polimorfismos em determinados *loci* de isolados de *P. jirovecii*. A identificação de SNPs relevantes poderá ser importante ao ponto de determinar perfis epidemiológicos e verificar a provável existência de subtipos genéticos com potencial patogénico elevado, e que deste modo poderão eventualmente influenciar a evolução clínica dos casos de PPc (Esteves *et al.* 2010a, 2011).

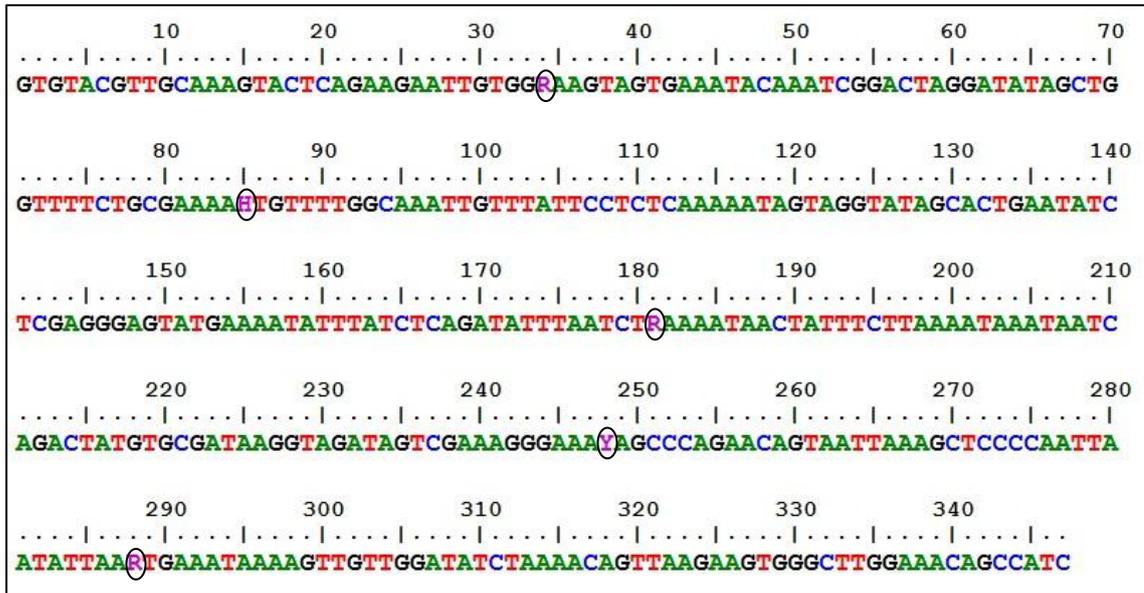
Neste tipo de estudos, os SNPs possuem um grande interesse, principalmente devido ao seu simples padrão de variação de base única (Kim & Misra 2007). A importância de um determinado SNP, está principalmente relacionada com a sua frequência, com a sua localização genómica e com a possível alteração que exerce (Kim & Misra 2007; Esteves *et al.* 2011).

Em *P. jirovecii*, o estudo da variabilidade genética polimórfica tem revelado a importância de certos *loci*, como mtLSU rRNA, SOD, DHPS, DHFR e CYB, e a possibilidade de alguns polimorfismos, nestas regiões, estarem relacionados com factores e parâmetros clínicos da infecção (Esteves *et al.* 2010a).

#### **1.8.2.1. Polimorfismos em mtLSU rRNA e sua importância clínica e epidemiológica**

O gene que codifica a mtLSU rRNA encontra-se relacionado com mecanismos básicos do metabolismo celular, particularmente durante a tradução, ao estabelecer a actividade *peptidyl transferase* para o ribossoma (Esteves *et al.* 2008, 2010b, 2011). Localizado no genoma mitocondrial, apesar de ser um gene que apresenta um elevado nível de conservação (Montes-Cano *et al.* 2004), a taxa de polimorfismos encontrada acaba por ser muitas vezes superior à observada em outros genes nucleares (Esteves *et al.* 2010a, 2010b). Considerado um dos marcadores moleculares mais informativos, pode ter grande utilidade na determinação de associações entre localizações geográficas, dados clínicos e demográficos, com génotipos específicos (Esteves *et al.* 2010b, 2011).

SNPs têm sido identificados neste *locus* (**Figura 8**), e a análise de sequências tem permitido a detecção de diferenças intra-específicas entre populações (Beard *et al.* 2000; Montes-Cano *et al.* 2004).



**Figura 8.** Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de mtLSU rRNA de *P. jirovecii*. As quatro bases azotadas encontram-se representadas pelas cores: verde (Adenina – A); azul (Citosina – C); vermelho (Timina – T) e preto (Guanina – G). Os SNPs, em destaque, estão identificados através da nomenclatura de nucleótidos segundo a norma IUPAC (ANEXO 1) e encontram-se representados pela cor roxa. (ilustração da autora, efectuada a partir da sequência *wild-type* de mtLSU rRNA de *P. jirovecii*, descrita por Sinclair *et al.* 1991).

Em *P. jirovecii*, variações polimórficas no gene mtLSU rRNA têm sido maioritariamente identificadas nas posições nucleotídicas 85 e 248 (Beard *et al.* 2004; Esteves *et al.* 2008). O polimorfismo na posição 85 é o que apresenta uma frequência mais elevada (Wakefield 1998b; Esteves *et al.* 2010a), tendo sido já caracterizados SNPs de três das quatro bases azotadas – timina (T), citosina (C) e adenina (A) (Wakefield 1998b). A análise da eventual importância clínica destes SNPs foi efectuada em alguns estudos recentemente (Miller *et al.* 2005b; Esteves *et al.* 2010a, 2011, 2012). Esteves *et al.* (2010a, 2011, 2012) constataram que estes SNPs (*mt85C*, *mt85A* e *mt85T*) poderão estar envolvidos com a capacidade patogénica de *P. jirovecii*, uma vez que já foram associados com parâmetros clínicos implicados com o grau de infecciosidade do microrganismo e a severidade da infecção.

### 1.8.2.2. Polimorfismos em SOD e sua importância clínica e epidemiológica

*P. jirovecii* está constantemente exposto a espécies reactivas de oxigénio, não apenas devido aos intermediários reactivos produzidos endogenamente, através de

processos metabólicos, como durante a síntese de adenosina trifosfato (ATP – *adenosine triphosphate*) na mitocôndria, mas também devido ao *stress* oxidativo derivado da acção de macrófagos alveolares e neutrófilos localizados no microambiente pulmonar alveolar onde se encontram (Pensanti 1984; Denis *et al.* 1998; Fréalle *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2011). O anião superóxido ( $O_2^-$ ) é um dos intermediários reactivos de oxigénio, que causa efeitos nocivos no microrganismo, ao danificar constituintes celulares, enzimas e ácidos nucleicos (Denis *et al.* 1998). A protecção contra a acção deste, e de outros radicais livres de oxigénio, é maioritariamente assegurada por um grupo de metaloenzimas ubíquas, conhecidas como superóxido dismutases (Denis *et al.* 1998, 2000; Miller *et al.* 2005a; Fréalle *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2010a, 2011), que se encontram envolvidas no sistema antioxidante celular e catalisam a dismutação de  $O_2^-$  em oxigénio e peróxido de hidrogénio (Denis *et al.* 1998; Fréalle *et al.* 2006).

Estas metaloenzimas possuem três classes principais de isoformas, descritas tendo em conta o cofactor enzimático presente no centro activo (Denis *et al.* 1998; Denis *et al.* 2000; Fréalle *et al.* 2006). Em *P. jirovecii* a caracterização molecular do *locus* SOD constatou que este gene codifica para a classe superóxido dismutase dependente de manganésio (MnSOD – *manganese superoxide dismutase*) (Denis *et al.* 2000). A genotipagem deste *locus* tem permitido a identificação de diferentes sequências polimórficas e SNPs (**Figura 9**) (Denis *et al.* 2000; Miller *et al.* 2005a; Esteves *et al.* 2010a, 2011).

Em *P. jirovecii*, os polimorfismos nas posições nucleotídicas 110 e 215 do *locus* SOD são as alterações genéticas mais frequentes (Esteves *et al.* 2011). Esteves *et al.* (2010a, 2011, 2012) referem que estes polimorfismos (*SOD110C*, *SOD110T*, *SOD215T* e *SOD215C*) poderão, muito provavelmente, estar relacionados com factores de virulência de isolados de *P. jirovecii*. De facto, a relevância de MnSOD ao nível patogénico, tem sido recentemente reportada noutras infecções fúngicas, contudo a verdadeira importância deste gene em termos clínicos continua mal esclarecida e definida (Fréalle *et al.* 2006).



electrões pela cadeia respiratória mitocondrial (Kaneshiro 2001). Neste mecanismo respiratório, a molécula ubiquinona possui uma função crucial, ao actuar como um transportador móvel de electrões entre os vários complexos intervenientes na cadeia. A ubiquinona recebe electrões a partir de desidrogenases, nos complexos I e II, transportando-os para os complexos aceptadores finais de electrões, como é o caso do complexo citocromo bc1 (Cushion *et al.* 2000; Kaneshiro *et al.* 2000, 2006; Kaneshiro 2001; Basselin *et al.* 2005). Bloqueios na cadeia respiratória, como a utilização de inibidores enzimáticos específicos, acarretam consequências graves para a célula, sendo uma forma eficaz no controlo de microrganismos patogénicos (Fisher & Meunier 2008). Consequentemente, a inibição do transporte de electrões conduz a uma redução do gradiente electroquímico de protão transmembranar, que resulta numa inactivação da fosforilação oxidativa e síntese de ATP (Kaneshiro *et al.* 2006).

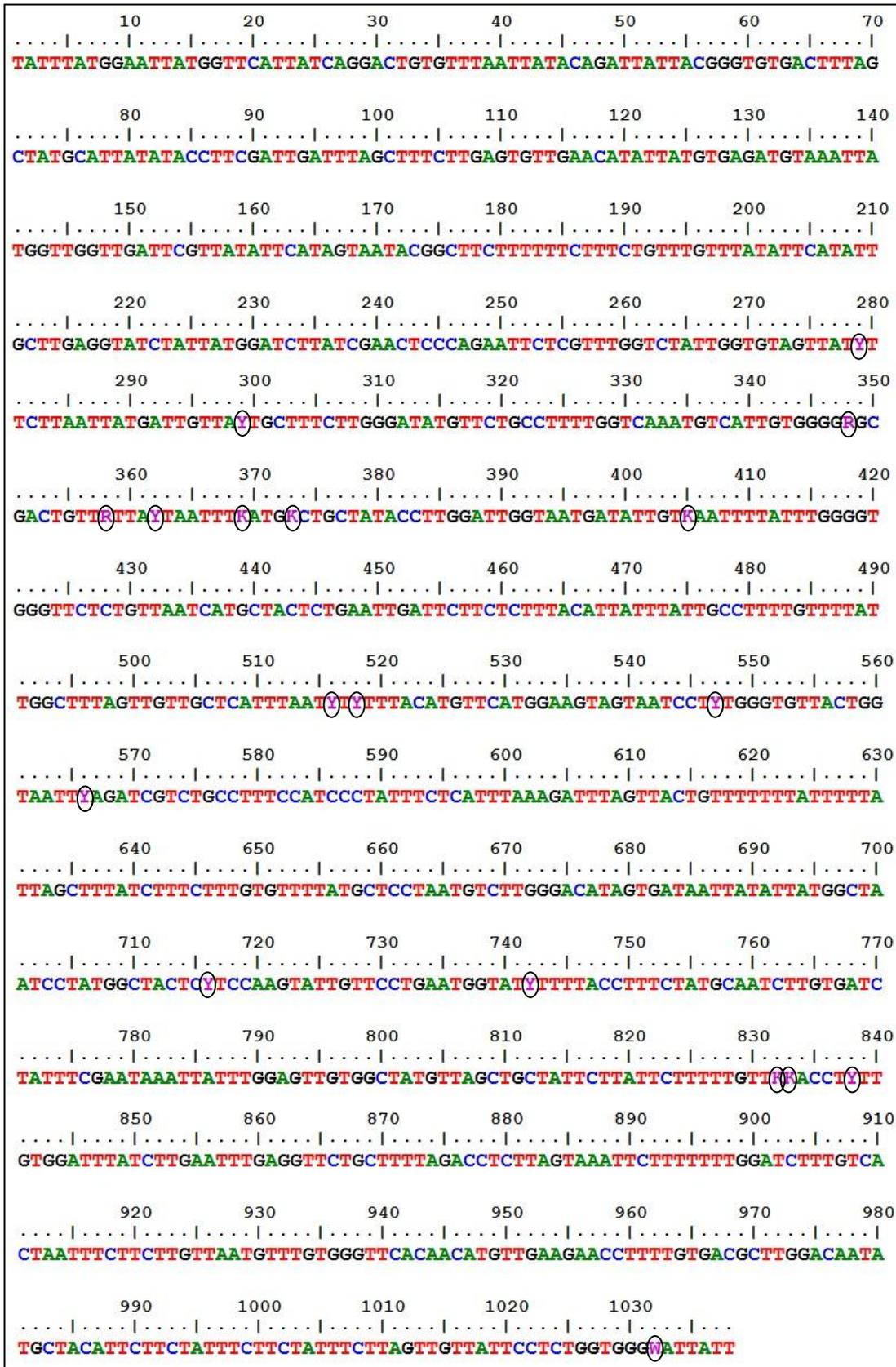
Atovaquona, um análogo da ubiquinona, possui um largo espectro de acção, sendo utilizado frequentemente contra infecções por protozoários ou contra doenças causadas por outros patogéneos eucariotas, como *P. jirovecii*, sendo aplicada como um fármaco de segunda linha, eficaz na profilaxia e no tratamento de casos leves a moderados de PPc (Walker *et al.* 1998; Cushion *et al.* 2000; Kaneshiro *et al.* 2000, 2006; Kaneshiro 2001; Hill *et al.* 2003). Esta molécula interfere no transporte de electrões ao inibir especificamente o complexo citocromo bc1, uma das principais enzimas chaves presente na membrana interna mitocondrial, inibindo o transporte de electrões ao ligar-se irreversivelmente ao citocromo b (Kazanjian *et al.* 2001; Kessl *et al.* 2004; Kaneshiro *et al.* 2006).

Mutações no gene CYB, presente no genoma mitocondrial, têm sido observadas em determinados parasitas patogénicos, como *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*, devido ao uso continuado de atovaquona para o tratamento das infecções provocadas por estes microrganismos. Estas mutações são frequentemente identificadas na região do domínio Q<sub>0</sub>, ou em regiões vizinhas adjacentes, e estão correlacionadas com um aumento de resistência a atovaquona (Kaneshiro 2001; Kazanjian *et al.* 2001; Hill *et al.* 2003), uma vez que alterações aminoacídicas neste local do gene poderão estar relacionadas com a afinidade de ligação do fármaco (Cushion *et al.* 2000; Kaneshiro 2001).

Polimorfismos no gene CYB em isolados de *P. jirovecii* também têm sido caracterizados (**Figura 10**), constatando-se que algumas mutações também podem induzir resistência à atovaquona, tal como já foi descrito para outros microrganismos (Walker *et al.* 1998; Kazanjian *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002b; Esteves *et al.* 2010a, 2010b). Walker *et al.* (1998), foram os primeiros a descrever mutações não sinónimas, particularmente nas posições nucleotídicas 362 e 369, localizadas na região Q<sub>0</sub> do gene CYB de *P. jirovecii*. Três anos mais tarde, Kazanjian *et al.* (2001), sugeriram que mutações neste gene podem estar associadas com a exposição prévia ao fármaco atovaquona, nomeadamente mutações pontuais não sinónimas encontradas nas posições nucleotídicas 299, 358, 362, 369, 373, 716, e 742, situadas próximas e na região do domínio Q<sub>0</sub>.

Contudo, uma relação directa entre mutações no gene CYB e resistência a atovaquona não pode ser facilmente demonstrada através da medição dos efeitos de atovaquona no crescimento *in vitro* ou pela actividade enzimática desta enzima, pelo facto da inexistência de técnicas de cultivo de isolados de *P. jirovecii* (Kazanjian *et al.* 2001; Hill *et al.* 2003). Alguns estudos têm utilizado organismos modelo, como *Saccharomyces cerevisiae* mutantes, para estudar o efeito das mutações localizadas no domínio Q<sub>0</sub> de CYB, observadas em microrganismos patogénicos como *P. jirovecii*, na cadeia respiratória e na sensibilidade ao fármaco, e verificar a base molecular de resistência à atovaquona (Hill *et al.* 2003; Kessl *et al.* 2004).

Outros estudos são necessários para verificar se a existência de mutações específicas no gene CYB podem efectivamente ter alguma relevância clínica e determinar previamente a resposta à terapêutica instituída com atovaquona, bem como para verificar a necessidade no desenvolvimento de novos fármacos anti-PPc (Kazanjian *et al.* 2001).



**Figura 10.** Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de CYB de *P. jirovecii*. As quatro bases azotadas encontram-se representadas pelas cores: verde (Adenina – A); azul (Citosina – C); vermelho (Timina – T) e preto (Guanina – G). Os SNPs, em destaque, estão identificados através da nomenclatura de nucleótidos segundo a norma IUPAC (ANEXO 1) e encontram-se representados pela cor roxa (ilustração da autora, efectuada a partir da sequência *wild-type* de CYB de *P. jirovecii*, descrita por Walker *et al.* 1998).

#### 1.8.2.4. Polimorfismos em DHPS e DHFR e sua importância clínica e epidemiológica

As espécies do género *Pneumocystis*, incluindo *P. jirovecii*, não são capazes de adquirir ácido fólico através de fontes ambientais, como acontece com os seus hospedeiros mamíferos, sendo necessário existir uma via endógena capaz de realizar a síntese *de novo* deste componente, importante ao nível celular, para a síntese de purinas, timidina, glicina e metionina (Armstrong *et al.* 2000; Matos & Esteves 2010a).

A maior parte dos fármacos utilizados na terapêutica e prevenção da PPc são agentes antagonistas desta via biossintética, sendo maioritariamente inibidores enzimáticos competitivos que, para além de actuarem contra *P. jirovecii*, também são eficazes contra uma grande variedade de microrganismos patogénicos, sobretudo inibindo as principais enzimas intervenientes na via do ácido fólico, levando a uma limitação de bases azotadas para a replicação, reparação e transcrição de DNA e também a uma falta de aminoácidos para a síntese protéica que invariavelmente provoca efeitos nefastos ao nível celular (Armstrong *et al.* 2000; Matos & Esteves 2010a).

SMZ, sulfadoxina e dapsona inibem a DHPS, primeira enzima envolvida no processo do ácido fólico (Nahimana *et al.* 2004), a qual catalisa a formação de 7,8-dihidropteroato, a partir da condensação de ácido *para*-aminobenzóico (PABA – *para*-aminobenzoic acid) com 7,8-dihidro-6-hidroximetilpterin-pirofosfato (DHPPP – *6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphate*) (Armstrong *et al.* 2000; Nahimana *et al.* 2004; Matos & Esteves 2010a); TMP e pirimetamina actuam sobre a enzima DHFR (Nahimana *et al.* 2004), que catalisa a redução de 7,8-dihidrofolato, formado a partir da conversão de 7,8-dihidropteroato pela acção da enzima *dihidrofolato sintetase*, a tetrahydrofolato (Armstrong *et al.* 2000; Nahimana *et al.* 2004; Matos & Esteves 2010a), fornecendo o ácido timidílico, vários aminoácidos e um grupo metil para a síntese de purinas (Esteves *et al.* 2010a). TMP-SMZ, combinação de fármacos, de primeira linha para a implementação da terapêutica e medidas preventivas da PPc, actua sob reacções sequenciais e inibe respectivamente as enzimas DHFR e DHPS, possuindo um efeito sinérgico em *P. jirovecii* (Ma *et al.* 1999; Matos & Esteves 2010a).

Consequentemente, a frequente utilização de inibidores enzimáticos, principalmente de agentes anti-folatos que actuam nas enzimas DHPS e DHFR, tem

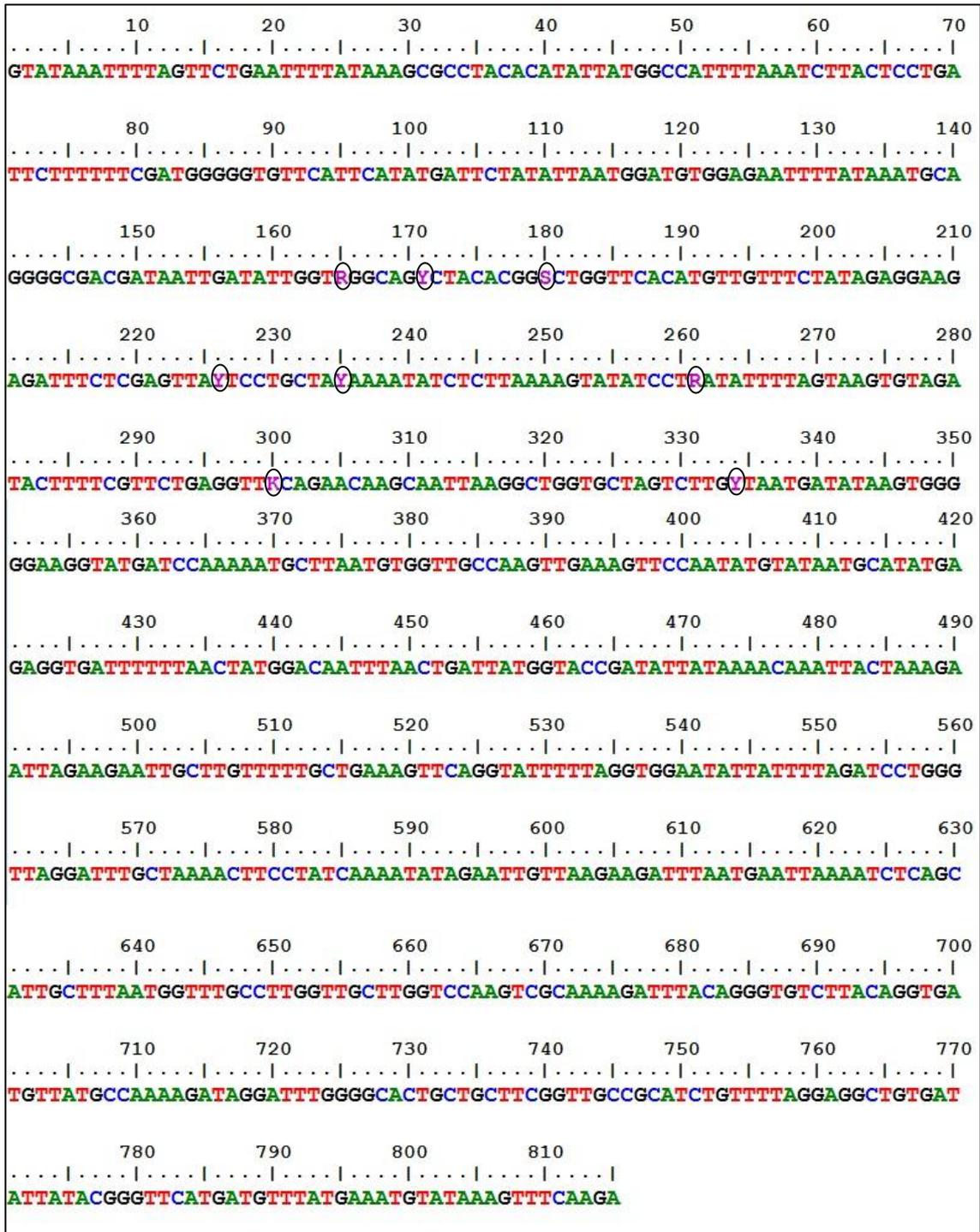
conduzido, nos últimos anos, ao desenvolvimento de resistências num grande número de bactérias e protozoários patogénicos (Ma *et al.* 1999), evidenciando a possibilidade do desenvolvimento deste tipo de resistências em outros microrganismos com importância médica, como é o caso de *P. jirovecii* (Helweg-Larsen *et al.* 1999; Ma *et al.* 1999). Em *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *P. falciparum*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, o estudo de eventuais mecanismos moleculares de resistência aos inibidores das enzimas DHPS e DHFR tem estabelecido que a principal causa genética para a resistência deve-se à presença de mutações pontuais (Lane *et al.* 1997; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Ma *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Takahashi *et al.* 2002a).

Particularmente, no gene DHPS, as mutações que conferem resistência às sulfonamidas encontram-se em regiões conservadas do *locus* (Helweg-Larsen *et al.* 1999). A suposição de que tais mutações também possam ocorrer em *P. jirovecii*, foi primeiramente verificada por Lane *et al.* (1997), que constataram algumas variações polimórficas não sinónimas, como é o caso das variações nas posições nucleotídicas 165, 171, 180, 334, em DHPS (**Figura 11**), sendo a maioria em regiões altamente conservadas e, em alguns casos, as alterações verificadas eram semelhantes às encontradas em outros microrganismos resistentes às sulfas. Actualmente, inúmeros estudos têm sido efectuados para tentar determinar a importância clínica destas variações, e o efeito de mutações na enzima DHPS de *P. jirovecii* tem sido constantemente analisado tendo em conta os parâmetros clínicos da doença (Kazanjian *et al.* 1998; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Ma *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2000; Robberts *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2010a, 2010b; Matos & Esteves 2010a).

As variações predominantes no gene DHPS e mais estudadas em *P. jirovecii*, são os SNPs nas posições nucleotídicas 165 e 171. Estes SNPs estão situados num dos centros activos da enzima, correspondentes aos codões 55 e 57 respectivamente, dando-lhes uma atenção especial por ocorrerem em regiões altamente conservadas e consideradas como *hot spot* para a resistência às sulfas em outros microrganismos patogénicos (Lane *et al.* 1997; Armstrong *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2000; Costa *et al.* 2005; Matos & Esteves 2010a). Comparações ao nível estrutural e funcional da enzima constataram que os codões 55, 56 e 57, caracterizados pela sequência aminoacídica

Thr-Arg-Pro, estão envolvidos directamente na ligação do substrato DHPPP e de sulfonamida à enzima DHPS (Ma *et al.* 1999). A descrição de mutações em locais homólogos a estes, noutros microrganismos, como em *P. falciparum*, *E. coli* e *S. pneumonia*, podem conduzir à diminuição da sensibilidade às sulfas e são normalmente associadas com casos de resistência (Ma *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000). Deste modo, tais mutações também podem reflectir o desenvolvimento de potencial resistência às sulfas por parte de *P. jirovecii* (Ma *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2000; Matos & Esteves 2010a).

A dificuldade em encontrar associações que comprovem definitivamente o aparecimento de resistências, está relacionado com o facto de que em *P. jirovecii* não existe a possibilidade de realização de testes de susceptibilidade a fármacos *in vitro* por métodos convencionais (Kazanjian *et al.* 2000). No entanto, os resultados dos estudos epidemiológicos moleculares constataam que, *P. jirovecii* está muito provavelmente, a desenvolver resistências (Ma *et al.* 1999), uma vez que, o aparecimento de mutações é uma possível consequência da exposição e uso continuado de fármacos, tais como o TMP-SMZ, que exercem uma pressão evolutiva selectiva sob os genótipos circulantes de *P. jirovecii* (Lane *et al.* 1997; Ma *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Robberts *et al.* 2005; Matos & Esteves 2010a).

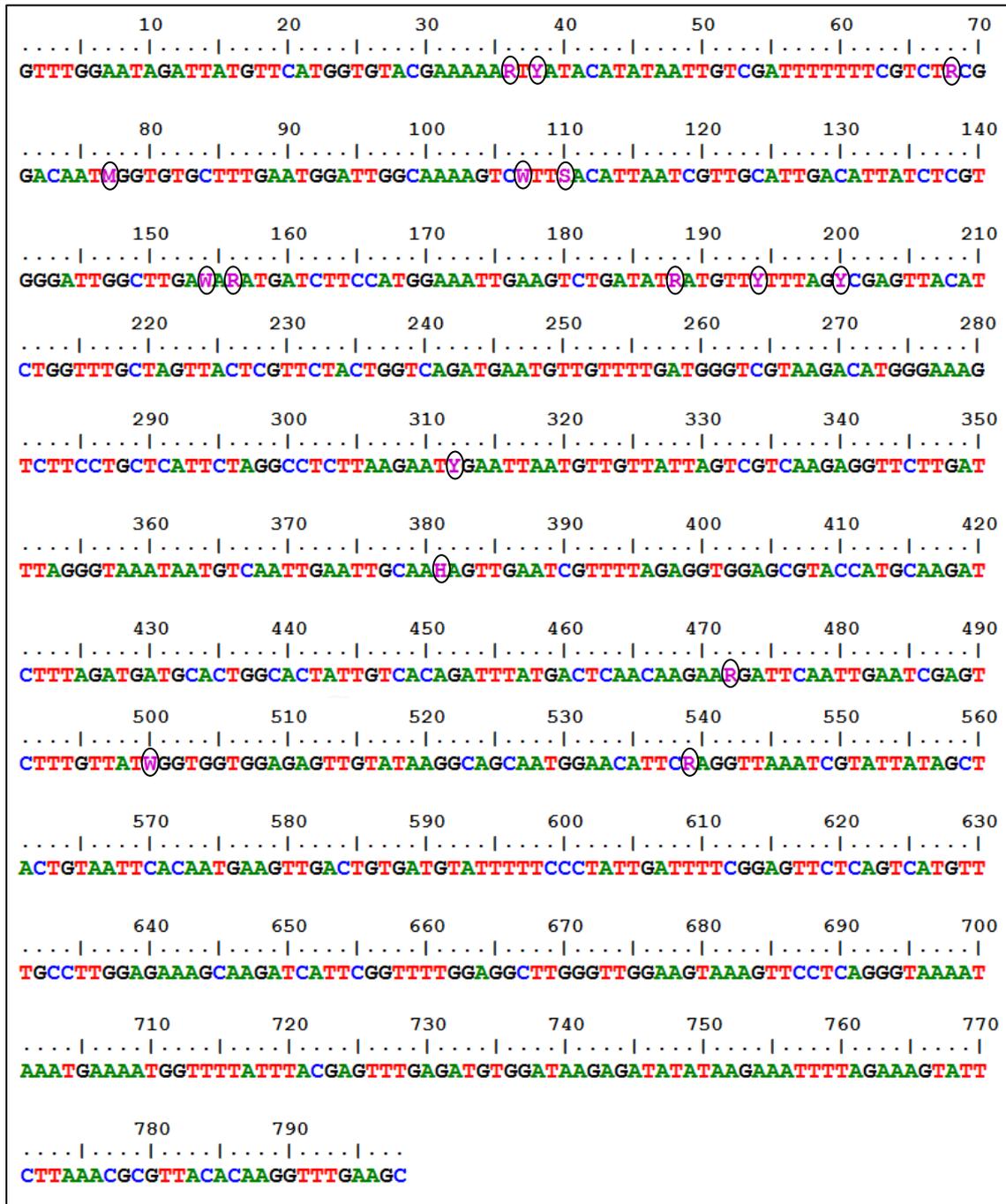


**Figura 11.** Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de DHPS de *P. jirovecii*. As quatro bases azotadas encontram-se representadas pelas cores: verde (Adenina – A); azul (Citosina – C); vermelho (Timina – T) e preto (Guanina – G). Os SNPs, em destaque, estão identificados através da nomenclatura de nucleótidos segundo a norma IUPAC (ANEXO 1) e encontram-se representados pela cor roxa (ilustração da autora, efectuada a partir da sequência *wild-type* de DHPS de *P. jirovecii*, descrita por Lane *et al.* 1997).

Em relação ao gene DHFR, alguns estudos genéticos têm sido direccionados para a investigação da heterogeneidade polimórfica deste *locus* em *P. jirovecii* (**Figura 12**) (Ma *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2002a; Nahimana *et al.* 2004; Robberts *et al.* 2005; Costa *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2010a, 2010b, 2011).

Ma *et al.*(1999), foram os primeiros a relatar sequências polimórficas no gene DHFR de *P. jirovecii*, descrevendo um polimorfismo sinónimo na posição nucleotídica 312 (a presença de uma C, em vez de uma T). A provável importância clínica, dos SNPs *DHFR312T* e *DHFR321C* foi referida em dois estudos recentemente (Esteves *et al.* 2010a, 2011), que indicam que polimorfismos na posição 312 do gene DHFR poderão, de alguma forma, estar envolvido com a severidade da infecção por *P. jirovecii* (Esteves *et al.* 2010a, 2011).

Em relação ao desenvolvimento de resistência, em DHFR, alterações ao nível enzimático, devido a mutações no gene, também podem representar mecanismos de resistência, aos seus principais inibidores, TMP e pirimetamina, em microrganismos com grande relevância clínica, como é o caso de *P. falciparum*, *S. aureus* e *S. pneumonia* (Takahashi *et al.* 2002a; Nahimana *et al.* 2004; Costa *et al.* 2006). De momento, ainda não foram encontradas associações significativas entre a ocorrência de polimorfismos no gene DHFR de *P. jirovecii* e a exposição prévia ao TMP-SMZ (Ma *et al.* 1999; Takahashi *et al.* 2002a; Robberts *et al.* 2005; Costa *et al.* 2006).



**Figura 12.** Representação ilustrativa das principais variações polimórficas de DHFR de *P. jirovecii*. As quatro bases azotadas encontram-se representadas pelas cores: verde (Adenina – A); azul (Citosina – C); vermelho (Timina – T) e preto (Guanina – G). Os SNPs, em destaque, estão identificados através da nomenclatura de nucleótidos segundo a norma IUPAC (ANEXO 1) e encontram-se representados pela cor roxa (ilustração da autora, efectuada a partir da sequência *wild-type* de DHFR de *P. jirovecii*, descrita por Ma *et al.* 1999).

Num único estudo publicado em 2004, Nahimana *et al.* (2004), detectaram seis polimorfismos não sinónimos em regiões conservadas, alguns posicionados em locais

eventualmente pertencentes ao centro activo enzimático da enzima DHFR, os quais provavelmente provocam alterações estruturais que podem reduzir a afinidade da enzima em relação aos seus inibidores, sendo que, duas delas já se encontram relacionadas com fenómenos de resistência noutros microrganismos. De facto, uma associação significativa foi verificada entre mutações no gene DHFR e o insucesso na profilaxia com o uso de inibidores da enzima DHFR de *P. jirovecii* de segunda linha, raramente utilizados, particularmente com a pirimetamina. Estes dados sugerem que populações de *P. jirovecii* podem estar a ser submetidas a uma pressão selectiva, devido ao uso de inibidores enzimáticos, e que determinadas mutações no gene da DHFR podem eventualmente contribuir para a resistência a fármacos como a pirimetamina. Deve-se realçar ainda que este fármaco exerce uma pressão mais elevada no gene da DHFR de *P. jirovecii* do que o TMP, uma vez que estudos cinéticos já comprovaram que este é um inibidor enzimático mais fraco em relação a outros agentes como a pirimetamina, considerada quatro vezes mais forte (Nahimana *et al.* 2004).

### 1.8.3. Aplicabilidade e importância epidemiológica da genotipagem *multilocus* em *P. jirovecii*

A evolução de um determinado caso de PPc encontra-se dependente de várias variáveis clínicas, que podem ter um papel preponderante na doença, influenciando deste modo o seu prognóstico (Matos & Esteves 2010b). Uma forma de tentar minimizar o impacto clínico do patógeno *P. jirovecii*, e conhecer melhor a complexidade patológica da PPc, será compreender a epidemiologia molecular desta infecção (Ripamonti *et al.* 2009). Deste modo, a caracterização genética de isolados, com o intuito de relacionar a diversidade intra-específica de *P. jirovecii* com vários aspectos demográficos e clínicos da PPc, poderá ser um dos factores a considerar durante o processo de decisão clínica (Esteves *et al.* 2010a; Matos & Esteves 2010b), sendo de grande utilidade para a identificação de casos que apresentam isolados de *P. jirovecii* potencialmente mais patogénicos e/ou resistentes (Esteves *et al.* 2011).

Como já foi referido, estudos sobre a caracterização genética de isolados desta espécie têm constatado que SNPs específicos encontram-se estatisticamente associados com determinadas características epidemiológicas; e alguns indicam mesmo que, provavelmente, alguns destes perfis epidemiológicos poderão estar dependentes da ocorrência de uma associação entre múltiplos polimorfismos situados em diferentes regiões genómicas de *P. jirovecii*, definidos como haplótipos (Matos & Esteves 2010b). Desta forma, a relevância da genotipagem *multilocus*, correntemente aplicada na caracterização de outras espécies patogénicas, começou a ter um grande impacto neste tipo de estudos em *P. jirovecii* (Matos & Esteves 2010b).

Estudos de genotipagem *multilocus*, ao verificarem associações de haplótipos com determinados parâmetros clínicos, como severidade da PPc e insucesso profilático anti-PPc, têm verificado que haplótipos específicos podem, de certa forma, interferir na evolução clínica dos casos de PPc (Hauser *et al.* 2001b; Esteves *et al.* 2010a, 2011, 2012; Matos & Esteves 2010b). Assim, põe-se em evidência que, muito provavelmente, a caracterização de múltiplos polimorfismos trará dados relevantes para a compreensão da infecção por *P. jirovecii* (Esteves *et al.* 2010a; Matos & Esteves 2010b), uma vez que a genotipagem *multilocus* permite a caracterização simultânea de vários SNPs, em

*loci* distintos e independentes, fornecendo assim mais informação, do que a simples genotipagem de apenas um *locus* (Esteves *et al.* 2008, 2010a; Matos & Esteves 2010b).

A aplicabilidade/funcionalidade deste tipo de genotipagem poderá ser influenciada por aspectos metodológicos relacionados com custo-benefício, precisão e rendimento da técnica a utilizar, bem como a facilidade na interpretação dos resultados, morosidade, e dificuldade da técnica (Olive & Bean 1999; Kim & Misra 2007). Métodos mais robustos, de forma a alcançar estes e outros requisitos indispensáveis, devem ser utilizados neste tipo de abordagens genéticas (Kim & Misra 2007). A maioria das tecnologias de genotipagem, conhecidas actualmente, requerem um passo de amplificação de DNA pela PCR, de forma a garantir quantidade suficiente de produto genómico de interesse; e posterior detecção de SNPs para a determinação e caracterização do genótipo/isolado (Kim & Misra 2007).

Técnicas promissoras de alto rendimento com formato em larga escala, como a PCR *Multiplex* (MPCR – *Multiplex PCR*) associada com a técnica de extensão em base única (SBE – *Single Base Extension*) podem ser utilizadas de maneira a garantir o estudo de uma grande quantidade de isolados e verificar a potencial relação entre haplótipos de *P. jirovecii* e parâmetros clínicos da PPc (Matos & Esteves 2010b). Esteves *et al.* (2011), demonstraram que esta metodologia, MPCR/SBE, é mais adequada para estudos *multilocus* do que as técnicas moleculares convencionais, sendo um método de elevada sensibilidade, com um alto rendimento e fiabilidade, para a genotipagem *multilocus* de SNPs em *P. jirovecii*.

## OBJECTIVOS

### Objectivos gerais:

Constatando a importância actual de estudos sobre a epidemiologia molecular de *P. jirovecii*, esta dissertação teve como principal objectivo a caracterização de múltiplos polimorfismos desta espécie, a partir da utilização de técnicas moleculares promissoras.

A metodologia MPCR/SBE foi utilizada para a amplificação simultânea de três regiões genómicas do microrganismo (mtLSU rRNA, SOD e DHPS), reconhecidas como marcadores genéticos adequados; bem como para a genotipagem *multilocus* de cinco SNPs (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*), considerados relevantes pelo facto de terem sido previamente associados com parâmetros da infecção.

A caracterização genética efectuada no decorrer do presente estudo teve como principal finalidade a detecção de eventuais associações entre SNPs, haplótipos e múltiplos genótipos, com dados clínicos e demográficos, e verificar a importância de associações estatisticamente significativas com a apresentação clínica e evolução dos casos de PPc.

### Objectivos específicos:

- i. Seleccionar os marcadores genéticos mais informativos para o estudo *multilocus* em *P. jirovecii*.
- ii. Identificar a frequência e os padrões de distribuição dos SNPs em estudo.
- iii. Determinar a diversidade genotípica existente nos isolados de *P. jirovecii*.
- iv. Analisar a provável importância epidemiológica da diversidade genética de *P. jirovecii* com parâmetros da infecção.
- v. Identificar prováveis associações entre os SNPs em estudo.
- vi. Compreender a estrutura populacional da espécie *P. jirovecii*.
- vii. Considerar a importância da metodologia MPCR/SBE para a epidemiologia da PPc.

---

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

## Considerações prévias

De modo a atingir os objectivos propostos, este estudo foi concretizado em cinco etapas principais, através da implementação de determinados procedimentos metodológicos, que serão descritos pormenorizadamente ao longo deste capítulo.

A **primeira etapa** consistiu na selecção de alguns isolados de *P. jirovecii* para o estudo *multilocus*, obtidos a partir de amostras biológicas de secreções pulmonares provenientes de doentes com suspeita clínica de PPc. Na secção “2.1. Caracterização da amostra/População em estudo” será definido o número de isolados introduzidos no estudo bem como o tipo e origem das amostras biológicas, sendo também definida a população de doentes deste estudo e as informações epidemiológicas que foram facultadas.

A **segunda etapa** consistiu na confirmação da positividade de todas as amostras seleccionadas para o estudo *multilocus*. Na secção “2.2. Processamento de amostras respiratórias – secreções pulmonares” será descrito o pré-tratamento específico que foi necessário efectuar em cada uma das amostras ao chegarem ao laboratório. Este tratamento foi realizado, durante o presente estudo, em 48 amostras que chegaram ao laboratório entre 2011 e 2012. A identificação e confirmação de *P. jirovecii*, em todas as amostras biológicas seleccionadas, foi efectuada através do diagnóstico parasitológico e molecular por técnicas correntemente implementadas ao nível laboratorial (secção “2.3. Identificação de *P. jirovecii* nos produtos biológicos processados”).

A **terceira etapa** consistiu na escolha dos marcadores genéticos com maior importância epidemiológica para o estudo *multilocus*. Na secção “2.4. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos” serão definidos os critérios para a selecção dos marcadores, de entre as regiões mtLSU rRNA, SOD, CYB, DHPS e DHFR do genoma de *P. jirovecii*. Para esta escolha, foi tida em conta a informação obtida através de uma extensa análise bibliográfica, sobre as cinco regiões genómicas a considerar, bem como a realização e análise dos resultados de um estudo preliminar efectuado com o propósito de caracterizar geneticamente alguns dos marcadores eleitos (nomeadamente os genes CYB e DHPS) em isolados de *P. jirovecii* escolhidos aleatoriamente para o efeito.

A **quarta etapa** consistiu na execução do estudo genético *multilocus*, através da abordagem metodológica MPCR/SBE. Na secção “2.5. Metodologia MPCR/SBE” serão relatados os princípios básicos das técnicas que foram utilizadas bem como os principais procedimentos efectuados e as condições de optimização para uma correcta genotipagem *multilocus* dos isolados de *P. jirovecii*.

A **quinta etapa** consistiu na avaliação e interpretação de todos os resultados obtidos ao longo deste trabalho, e que serão apresentados e discutidos ao longo dos próximos dois capítulos “3. Resultados” e “4. Discussão e Conclusões”. Na secção “2.6. Interpretação dos resultados” deste capítulo, serão descritos os principais testes utilizados para a análise estatística e genética aplicada para o estudo e caracterização de isolados de *P. jirovecii* em Portugal.

## 2.1. Caracterização da amostra/População em estudo

De um total de 145 amostras de secreções pulmonares disponíveis, 66 amostras (58 LBA e oito EI), previamente caracterizadas como sendo positivas para o patógeno oportunista *P. jirovecii*, através do diagnóstico laboratorial, foram aleatoriamente incluídas para o estudo genético *multilocus*. As amostras são originárias de 66 indivíduos pertencentes a um grupo de doentes imunocomprometidos com sintomatologia pulmonar, sugestiva de PPC.

As amostras seleccionadas, bem como toda a informação clínica disponível de cada doente, são provenientes de diferentes hospitais situados na região de Lisboa, Portugal, no período compreendido entre os meses de Fevereiro de 2001 e Setembro de 2012, e encaminhadas para o laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT-UNL), para procedimento de diagnóstico laboratorial.

As informações relativas aos doentes incluídos no estudo foram obtidas, no período da colheita da amostra biológica, após a assinatura do consentimento informado por parte destes, aprovado pelos conselhos de Ética das instituições participantes. De entre os dados recolhidos encontram-se, para além de informações demográficas (género e idade), importantes parâmetros como diagnóstico clínico, dados laboratoriais, eventuais medidas profiláticas e terapêuticas aplicadas contra a PPC, bem como a evolução clínica e o prognóstico dos doentes, quando disponibilizados. Todas as informações foram recolhidas com o intuito de verificar as associações estatísticas mencionadas na secção “2.6. Interpretação dos resultados”.

É importante referir que, para além dos 66 isolados introduzidos no estudo genético *multilocus*, cerca de 45 isolados de *P. jirovecii* foram também escolhidos aleatoriamente para um estudo preliminar de caracterização genética, apenas para verificar a variabilidade genética dos marcadores CYB e DHPS de isolados de *P. jirovecii* em Portugal (ver secção “2.4.1. Caracterização genética de isolados – estudo preliminar dos genes CYB e DHPS” neste capítulo). Estes isolados, escolhidos aleatoriamente, provêm de amostras de secreções pulmonares de doentes imunocomprometidos, semelhante à população caracterizada neste estudo.

## 2.2. Processamento de amostras respiratórias – secreções pulmonares

Todas as amostras de secreções pulmonares, LBA e EI, foram devidamente colhidas, a partir de indivíduos com suspeita clínica de PPc, pelas entidades/instituições hospitalares de que são provenientes, por um processo habitual descrito em Matos *et al.* (1995, 2006). Todas as amostras foram devidamente identificadas, acondicionadas e transportadas até ao seu local de destino, situado no laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários, da Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica do IHMT-UNL, de modo a serem submetidas ao diagnóstico laboratorial da PPc.

Antes da análise do material biológico, foi realizado um pré-tratamento, em que cada amostra, foi correctamente processada de forma a ser devidamente descontaminada, homogeneizada e concentrada. Todos estes procedimentos, referidos na secção “2.2.1. Processamento de amostras de LBA” e “2.2.2. Processamento de amostras de EI”, foram efectuados com as devidas precauções de segurança e de conservação das amostras recomendadas.

### 2.2.1. Processamento de amostras de LBA

O processamento das amostras de LBA iniciou-se com a homogeneização da amostra e transferência do seu volume total para tubos de centrífuga. A centrifugação, na centrífuga Kubota 4000 (Kubota Corporation), a 4100 g, durante 20 minutos, seguida da remoção do sobrenadante, e ressuspensão do sedimento em 0,5 mL de tampão fosfato salino (PBS – *Phosphate-Buffered Saline*) (BioMérieux), foi efectuada com o objectivo de concentrar a amostra biológica.

Com o sedimento ressuspendido, fizeram-se três esfregaços em lâminas tratadas com poly-L-lisina (Menzel Glaser – Thermo Scientific) e após a secagem dos esfregaços, à temperatura ambiente, procedeu-se à fixação dos mesmos por imersão em acetona (Panreac Química S.L.U.), durante 10 minutos. Por fim, transferiu-se o restante material biológico para tubos de *ependorf* de 1,5 mL e guardou-se a -80°C, para processos posteriores, nomeadamente extracção de DNA. Utilizou-se uma das lâminas

para o diagnóstico parasitológico, pela técnica de IFI e conservou-se as restantes a -20°C.

### **2.2.2. Processamento de amostras de EI**

Para o processamento deste tipo de amostras foi necessário um passo inicial que consistiu num tratamento prévio com uma substância mucolítica – ditiotreitól (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), utilizado para tornar este tipo de amostra pulmonar menos viscosa, de forma a facilitar a eliminação do muco. Desta forma, adicionou-se à amostra igual volume do agente químico ditiotreitól, a 0,1% em água destilada, e após agitação no *vortex* (Velp Scientifica<sup>®</sup>), até a homogeneização completa da solução, incubou-se numa estufa (Heraeus) a 37°C, durante 30 minutos, procedendo-se a agitação da solução, de 10 em 10 minutos, para facilitar o processo de solvência e solubilização. Posteriormente, transferiu-se o volume total da solução para tubos de centrífuga e adicionou-se PBS (BioMérieux) até perfazer o volume total do tubo. A partir deste ponto os procedimentos efectuados foram idênticos aos descritos anteriormente para as amostras de LBA (ver secção “2.2.1. Processamento de amostras de LBA”).

### 2.3. Identificação de *P. jirovecii* nos produtos biológicos processados

De forma a proceder à identificação do patógeno, cada uma das amostras processadas, foi submetida a duas técnicas correntemente utilizadas para o diagnóstico laboratorial deste microrganismo. Primeiramente, foi aplicada a técnica de IFI, para a observação microscópica de formas morfológicas quísticas de *P. jirovecii*; seguida da aplicação de uma técnica derivada da PCR convencional, a *nested*-PCR, para a detecção de DNA genómico, através da amplificação de um fragmento específico do gene mtLSU rRNA de *P. jirovecii*.

#### 2.3.1 Diagnóstico parasitológico – detecção microscópica de quistos de *P. jirovecii* por IFI com AcM

O diagnóstico parasitológico de todas as amostras foi realizado pelo Monofluo™ Kit *P. jirovecii* (Bio-Rad Laboratoires Lda), que permite a identificação rápida e específica de quistos de *P. jirovecii*, em material biológico como LBA e EI, através da identificação de Ag de superfície, utilizando AcM. Esta técnica foi aplicada seguindo as instruções e utilizando todos os constituintes e reagentes disponibilizados pelo fabricante (Bio-Rad Laboratoires Lda).

Para cada lâmina, o procedimento efectuado iniciou-se com uma diluição de 1:10 da enzima tripsina, previamente reconstituída com 250 µL de HCl 0.001 M. Para tal, diluiu-se 2 µL da enzima em 18 µL de diluente enzimático. Aplicou-se a diluição (com um volume final de 20 µL) sobre a lâmina e espalhou-se suavemente, assegurando-se de que toda a superfície do esfregaço ficasse submersa. Incubou-se em câmara húmida, a 37°C, durante 30 minutos, numa estufa (Heraeus), para uma correcta digestão da parede celular quística do microrganismo, dirigida para as proteínas de superfície, de forma a facilitar a exposição de epítomos específicos. Em seguida, lavou-se a lâmina cuidadosamente com água destilada, tendo a atenção de não conduzir o jacto de água directamente sobre o esfregaço e, após secagem, aplicou-se 20 µL de AcM murino anti-*P. jirovecii*, específico para os Ag presentes na parede quística de *P. jirovecii*. Espalhou-se suavemente até toda a superfície do esfregaço estar revestida, e incubou-se, novamente, em câmara húmida, a 37°C, durante 15 minutos, procedendo a lavagem da lâmina como já indicado. Depois de seca, aplicou-se, em toda a superfície

do esfregaço, 20 µL de conjugado com fluoresceína – Ac anti-rato conjugado de isocotianato de fluoresceína, o qual se liga especificamente ao complexo Ag-Ac, emitindo fluorescência de coloração específica, quando exposto a um determinado comprimento de onda. Incubou-se nas mesmas condições referidas anteriormente, e após lavagem e secagem da lâmina procedeu-se a montagem da preparação, em lamela, utilizando uma gota de meio de montagem.

A leitura da preparação foi realizada, num microscópio óptico de fluorescência (Olympus U-RFL-T), a um comprimento de onda de 475 nm, tendo a atenção de observar cuidadosamente todos os campos da preparação, registando-se de seguida o resultado observado.

Para a interpretação dos resultados, é necessário ter em conta que uma lâmina de um esfregaço proveniente de uma amostra biológica de LBA ou EI, é considerada positiva quando são observados dois ou mais quistos, com paredes espessas, de forma oval ou arredondada, de aproximadamente 4 a 8 µm de diâmetro, apresentando fluorescência de coloração verde alface brilhante, podendo os organismos apresentarem-se isolados ou agrupados. Em contrapartida, considera-se um resultado inconclusivo quando se observa apenas uma forma quística, e um resultado negativo, quando em toda a lâmina não se observa qualquer forma oval ou arredondada de coloração fluorescente específica (Matos *et al.* 2006).

### **2.3.2 Diagnóstico molecular – amplificação do *locus* mtLSU rRNA pela *nested*-PCR**

A utilização de técnicas baseadas na PCR, como a *nested*-PCR, para a detecção de DNA de *P. jirovecii* em amostras biológicas, tem vindo a ser utilizada como técnica auxiliar ao diagnóstico convencional, uma vez que se torna possível a detecção de DNA em amostras com carga parasitária baixa, dificilmente detectada com as técnicas parasitológicas habituais (Tamburrini *et al.* 1993; Matos *et al.* 2000).

De forma a proceder ao diagnóstico molecular, todas as amostras de LBA e EI, previamente processadas, foram submetidas a um processo de extracção de DNA disponível, e correntemente utilizado no laboratório, o método de mini beadbeeter/tiocianato de guanidina-sílica.

### 2.3.2.1. Extracção de DNA genómico pelo método de mini beadbeater/tiocianato de guanidina-sílica

Este método de extracção de DNA, adaptado de procedimentos previamente descritos em Boom *et al.* (1990) e Patel *et al.* (1998), baseia-se essencialmente em quatro etapas constituídas por, lise mecânica associada a propriedades de lise celular química e inactivação de nucleases do agente tiocinato de guanidina, adsorção do DNA partindo das propriedades de ligação do DNA às partículas de sílica, seguido por processos de lavagens e eluição do DNA (Boom *et al.* 1990).

Esta metodologia iniciou-se com adição de 0,3 g de partículas de zircónio (com 0,5 mm de diâmetro) (Biospec Products), 900 µL de tampão de lise (constituído por 7M tiocinato de guanidina, Calbiochem; 50 mM Tris-HCl [pH 6.4], Calbiochem - Sigma - Aldrich; 25 mM EDTA [pH 8.0], Merck; e 1,5% Triton X-100, Serva) e 60 µL de álcool isoamílico (Merck) num tubo de reacção de 2 mL com tampa de rosca, seguindo-se a adição de 400 µL da amostra, LBA ou EI, previamente processada. Agitou-se à velocidade máxima de 2800 oscilações/minuto, no aparelho Mini BeadBeater (Biospec Products), durante aproximadamente dois minutos, de forma a facilitar a ruptura da parede quística, induzida por *stress* físico. Centrifugou-se, na centrífuga Kubota 3000 (Kubota Corporation), à velocidade máxima de 23100 g, durante 15 segundos, de forma a sedimentar os detritos insolúveis e as partículas de zircónio, antes de transferir o sobrenadante para um novo tubo de *ependorf* de 1,5 mL.

De forma a garantir a adsorção do DNA, adicionou-se ao sobrenadante 40 µL de uma suspensão aquosa de sílica em pó a 1% [pH 2.0] (Sigma-Aldrich), que permite a ligação do DNA, pelo facto de estar carregada positivamente e de apresentar um pH baixo. Após agitação no *vortex* (Velp Scientifica<sup>®</sup>), incubou-se à temperatura ambiente, sob agitação constante, durante cerca de uma hora, num agitador rotativo para laboratório (Frobel Labortechnit GmbH). A sedimentação da sílica com o DNA adsorvido foi efectuada por centrifugação, à velocidade máxima (23100 g), durante 15 segundos, desprezando de seguida o sobrenadante.

Posteriormente procedeu-se às etapas de lavagem, que consistiram na ressuspensão da sílica, com soluções e solventes apropriados, seguido de centrifugação à velocidade máxima (23100 g), durante 15 segundos. Deste modo, lavou-se o

sedimento, duas vezes com 200 µL de tampão de lavagem (constituído por 7 M tiocinato de guanidina, Calbiochem e 50 mM Tris-HCl [pH 6.4], Calbiochem- Sigma-Aldrich); uma vez com 200 µL de etanol (Panreac Quimica, S.A.U.) a 80% a -20°C; e uma vez com 200 µL de acetona absoluta (Panreac Quimica, S.A.); por fim desprezou-se a acetona e incubou-se a 70°C, no *Block Heater* (Stuart Scientific) até à evaporação completa do solvente.

Por último, ressuspendeu-se a sílica, com o DNA adsorvido, em 60 µL de água destilada estéril, e incubou-se a 60°C, durante 10 minutos, para facilitar a eluição do DNA. Sedimentou-se a sílica por centrifugação à velocidade máxima (23100 g), durante dois minutos. Recolheu-se o sobrenadante, com o DNA dissolvido, para um tubo de *eppendorf* limpo e conservou-se a -20°C.

### 2.3.2.2. Amplificação do *locus* mtLSU rRNA pela *nested*-PCR

Neste estudo, a detecção molecular de *P. jirovecii* nas amostras de secreções pulmonares, foi efectuada através da amplificação do gene mitocondrial multicópia mtLSU rRNA. A análise deste *locus*, pela *nested*-PCR, foi realizada com pares de *primers* específicos complementares à região do gene escolhida. O par de *primers* pAZ 102-E – pAZ 102-H, foi desenhado especificamente para a primeira etapa de amplificação, sendo, deste modo, considerado como o conjunto de oligonucleótidos externos desta *nested*-PCR; conseqüentemente o par de *primers* pAZ 102-X – pAZ 102-Y, designados pelo conjunto de *primers* internos, foram desenhados para serem utilizados na segunda etapa de amplificação (Wakefield 1996; Tsolaki *et al.* 1998; Matos *et al.* 2001). As principais características dos pares de *primers* utilizados estão descritas no **Quadro I**.

**Quadro I.** Características dos *primers* utilizados para o diagnóstico molecular por amplificação do gene mtLSU rRNA pela *nested*-PCR. Os *primers* foram descritos pela primeira vez por Wakefield *et al.* 1990 e Tamburrini *et al.* 1996.

<i>Locus</i>	<i>Primers</i>	Sequência (5' → 3')	Tamanho (pb)	Tm* (°C)	% GC	Produto (pb)
mtLSU rRNA	pAZ 102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	20	61.8	55	346
	pAZ 102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC	20	46.9	45	
	pAZ 102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	22	52.1	41	263
	pAZ 102-Y	TCACTTAATATTAATTGGGGAGC	23	53.3	35	

\*A temperatura de desnaturação (Tm) foi calculada com o auxílio do programa Primer Express 3.0.

Para a amplificação do fragmento pretendido com 263 pb, foi otimizada, para ambas as etapas sequenciais de amplificação, uma mistura de reacção com volume final de 25 µL por amostra. As condições de amplificação, para as duas etapas, processadas no termociclador *T1 Thermocycler* (Biometra®), encontram-se descritas no **Quadro II**. Sendo também necessário referir que, para a primeira etapa de reacção, 2 µL da amostra de DNA genómico extraído foram adicionados a 1X tampão de reacção (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0,01% Tween-20) (Bioline), 0,2 µM de cada *primer* pAZ 102-E e pAZ 102-H (MWG Biotech), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs – *deoxyribonucleotide triphosphates*) (Applied Biosystems), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), 0,01 µg/µL de albumina sérica bovina (BSA – *Bovine Serum Albumin*) (Fermentas), 0,75 U de BioTaq™ DNA polimerase (Bioline), perfazendo o volume final de 25 µL com água desionizada estéril. Para a segunda etapa de amplificação, os componentes utilizados estavam nas mesmas condições e concentrações referidas anteriormente, com excepção de ter sido utilizado o conjunto de *primers* internos, adicionando-se 0,2 µM de cada *primer* pAZ 102-X – pAZ 102-Y (MWG Biotech), e 2 µL de produto de PCR da primeira etapa de reacção, como molde de DNA. De forma a verificar a qualidade das condições de amplificação, uma amostra de controlo positivo (com suspensão de DNA genómico de *P. jirovecii*) foi utilizada durante o processo. Como indicador da inexistência de

contaminação por DNA exógeno, foi incluída uma amostra de controlo negativo (com todos os componentes da mistura de reacção, com água no lugar do DNA molde) utilizada nas duas etapas de reacção desta *nested*-PCR.

**Quadro II.** Condições térmicas de amplificação do gene mtLSU rRNA de *P. jirovecii* utilizadas nas duas etapas da *nested*-PCR.

Etapas PCR	Programa PCR	
Desnaturação inicial	94°C – 3 min	39 Ciclos de amplificação
Desnaturação	94°C – 1 min	
Ligação	55°C – 1 min	
Extensão	72°C – 1min	
Extensão Final	72°C – 10 min	

Para a visualização do DNA amplificado, os fragmentos de DNA obtidos foram submetidos a electroforese em gel de agarose. Para tal, 10 µL da mistura de reacção da segunda etapa de amplificação, juntamente com 2 µL de tampão de aplicação (Fermentas), foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Vilber Lourmat) após electroforese em gel de agarose a 1% (m/v) (Merck), em 1X tampão TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA [pH 8.3]) (Sigma-aldrich), por coloração com brometo de etídio (Sigma-aldrich) a uma concentração final de 0,5 µg/mL, submetida a uma carga eléctrica de 100 V, durante aproximadamente 60 minutos. A visualização do fragmento de DNA da região mtLSU rRNA com 263 pb foi conseguida pela fluorescência emitida através da molécula de brometo de etídio que apresenta propriedades intercalantes com a cadeia de DNA, permitindo deste modo a sua detecção por luz UV. A estimativa do tamanho molecular de cada fragmento de DNA observado foi efectuada através da comparação com uma amostra de marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler™ – Fermentas).

### 2.3.3. Determinação da carga parasitária

A determinação da carga parasitária de cada uma das 66 amostras foi efectuada através da quantificação microscópica do número de formas quísticas de *P. jirovecii* observado por campo, durante o diagnóstico parasitológico, aqui efectuada através da técnica de IFI com AcM, e recorrendo também aos resultados da *nested*-PCR.

O **Quadro III** representa a classificação da carga parasitária padronizada neste estudo (Matos *et al.* 2001; Costa *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2010b, 2011).

**Quadro III.** Quantificação da carga parasitária das amostras.

Carga Parasitária	
Baixa	Nenhum quisto identificado (PCR positivo)
Moderada	1 a 30 quistos identificados em 30 campos*
Alta	2 ou mais quistos identificados por campo*

\*Cálculo estimado com a ampliação  $\times 1000$  (ocular  $\times 10$  e objectiva  $\times 100$ )

## 2.4. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos

Os *loci* mtLSU rRNA, SOD, CYB, DHPS e DHFR são actualmente reconhecidos como as principais regiões genómicas para o estudo epidemiológico molecular da espécie *P. jirovecii*. São normalmente referenciados como marcadores genéticos da infecção pelo facto de possuírem uma grande importância metabólica, ao estarem relacionados com mecanismos básicos celulares, e por apresentarem uma grande variabilidade genética, que eventualmente poderá influenciar a patogenicidade do microrganismo e a existência de diferentes padrões da infecção (Esteves *et al.* 2010a, 2011).

Antes do estudo *multilocus* foi necessário proceder à selecção dos marcadores genéticos ideais. A escolha baseou-se essencialmente na presença e prevalência de variações polimórficas, SNPs mais relevantes, com maior interesse a nível clínico e epidemiológico para este estudo.

Esta informação, para a maioria dos marcadores (mtLSU rRNA, SOD e DHFR), foi facultada através da análise de estudos efectuados recentemente, cuja abordagem foi direccionada para grupos de imunocomprometidos semelhantes à população analisada neste estudo (Costa *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b, 2011, 2012), de forma a constatar as principais associações encontradas entre os SNPs mais prevalentes e padrões clínicos e demográficos dos doentes. Contrariamente, para os marcadores CYB e DHPS, devido à escassez de informação bibliográfica actualizada disponível, referente a grupos semelhantes à população alvo do estudo, foi necessário proceder a uma análise prévia, para a caracterização genética de alguns isolados, seleccionados aleatoriamente, com o propósito de identificar os principais SNPs existentes e proceder a comparação das frequências aqui obtidas com os resultados de outros estudos epidemiológicos, efectuados ao longo dos últimos anos, de forma a constatar a importância clínica dos SNPs encontrados.

#### 2.4.1. Caracterização genética de isolados – estudo preliminar dos genes CYB e DHPS

O estudo preliminar dos genes CYB e DHPS envolveu 45 isolados de *P. jirovecii*. A caracterização genética foi efectuada através da amplificação pela PCR das regiões genómicas de interesse seguida por sequenciação e análise dos resultados obtidos.

#### 2.4.2. Amplificação dos loci CYB e DHPS pela PCR

Para o estudo preliminar do locus CYB, o par de *primers* CytbFw – CytbRw foi utilizado de forma a amplificar uma região do gene de aproximadamente 638 pb (Esteves *et al.* 2010a). O estudo do locus DHPS, por amplificação de uma região de 240 pb, foi conseguido através da utilização do par de *primers* DHPSFw1 – DHPSRw1, desenhado para o efeito no decorrer do presente estudo, através do programa bioinformático Primer3 (versão 0.4.0) disponível *on-line* em <http://frodo.wi.mit.edu/>. A escolha do par de *primers* ideal para a amplificação da região pretendida do gene DHPS foi efectuada através da análise de vários parâmetros tais como, a dimensão de cada *primer*, o cálculo da temperatura de desnaturação ( $T_m$  - do inglês *melting temperature*) com base no conteúdo de G e C, bem como a probabilidade de formação de estruturas secundárias (*hairpin*), e dímeros de *primers*. As principais características dos conjuntos de *primers* utilizados encontram-se descritas no **Quadro IV**.

**Quadro IV.** Características dos pares de *primers* utilizados para o estudo do gene DHPS e CYB pela PCR. O par de *primers* DHPSFw1 – DHPSRw1 foi desenhado neste estudo. O par de *primers* CytbFw – CytbRw foi descrito pela primeira vez por Esteves *et al.* 2010a.

<i>Locus</i>	<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	$T_m^*$ (°C)	% GC	Produto (pb)
DHPS	DHPSFw1	CGATGGGGGTGTTTCATTCATATG	23	61.9	48	240
	DHPSRw1	GCCTTAATTGCTTGTCTGCAACC	24	61.9	46	
CYB	CytbFw	CCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATT	24	58.6	42	638
	CytbRw	AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA	25	57.9	40	

\*A temperatura de desnaturação foi calculada com o auxílio do programa Primer Express 3.0.

Os fragmentos de DNA dos respectivos genes, CYB e DHPS, foram amplificados segundo as mesmas condições térmicas cíclicas de PCR, no termociclador *T1 Thermocycler* (Biometra®), descritas na **Quadro V**. Para cada uma das amostras submetidas a amplificação, a mistura de reacção foi efectuada num volume final de 25 µL, contendo 2 µL da amostra de DNA utilizada como molde, 1X tampão de reacção (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl [pH 8.8], 0,1% Tween-20) (Bioline), 0,2 mM de cada dNTP (Applied Biosystems), 1 µM de cada *primer* (CytbFw1 e CytbRw1; DHPSFw1 e DHPSRw1) (MWG Biotech), 0,5 U de BioTaq DNA polimerase (Bioline), 0,5 µg/µL de BSA (Fermentas) e 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Bioline), perfazendo o volume final de 25 µL com água desionizada estéril. Para cada PCR foram utilizados dois controlos de reacção, um positivo (suspensão de amostra de *P. jirovecii* conhecida) e outro negativo (com todos os componentes reaccionais, menos o DNA molde).

Os produtos de PCR foram analisados, através de electroforese em gel de agarose, como indicado na secção “2.3.2.2. Amplificação do *locus* mtLSU rRNA pela *nested*-PCR”. Após registo fotográfico, as bandas cujo tamanho rondava aproximadamente 638 pb para o gene CYB, e 240 pb para o gene DHPS, foram extraídas do gel de agarose, com o auxílio de um bisturi, e posteriormente purificadas e sequenciadas.

**Quadro V.** Condições térmicas de amplificação dos genes CYB e DHPS de *P. jirovecii* pela PCR.

Etapas PCR	Programa PCR	
Desnaturação Inicial	95°C – 10 min	
Desnaturação	95°C – 1 min	42 Ciclos de Amplificação
Ligação	61,5°C – 1 min	
Extensão	72°C – 1min	
Extensão Final	72°C – 10 min	

### 2.4.3. Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR é essencial para um processo de sequenciação satisfatório e com bons resultados. Esta etapa permite efectuar a remoção de sequências de *primers* e dNTPs em excesso, e eventuais resíduos que possam interferir na reacção de sequenciação.

Para a purificação dos produtos de PCR foi utilizado o kit comercial Jetquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed), seguindo todas as instruções do fabricante. O protocolo permite a extracção de fragmentos de DNA, entre os 40 e 10.000 pb, a partir de géis de agarose, e compreende quatro processos essenciais: solubilização da agarose na presença de um sal caotrópico concentrado, adsorção do DNA, seguido por lavagens e eluição do DNA.

Após reconstituição dos reagentes e soluções, o processamento para a purificação dos produtos iniciou-se pela adição de 400  $\mu$ L da solução L1 (constituída por NaClO<sub>4</sub>, acetato de sódio e TBE) por 100 mg de gel. Seguiu-se a incubação a 50°C, no *Block Heater* (Stuart Scientific), tendo-se tido o cuidado de agitar a mistura, no *vortex* (Velp Scientifica®), em intervalos de 10 minutos, de forma a ajudar o processo de solubilização. Após 30 minutos de incubação, transferiu-se a solução obtida, com a agarose já solubilizada, para uma coluna *Jetquick spin column* contida num tubo colector de 2 mL. Centrifugou-se, na centrífuga Kubota 3000 (Kubota Corporation), à velocidade máxima de 23100 g, durante um minuto, descartando o filtrado. De seguida, e para uma correcta e selectiva ligação do DNA à membrana de sílica e também para a eliminação de resíduos de agarose, adicionou-se 400  $\mu$ L de L1 e após um minuto à temperatura ambiente, centrifugou-se à velocidade máxima durante um minuto, descartando novamente o filtrado. O processo de lavagem foi iniciado, com a adição de 250  $\mu$ L de solução H2 (Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl). Após cinco minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se à velocidade máxima durante um minuto. Descartou-se o filtrado, e repetiu-se o processo de centrifugação para a remoção completa da solução H2 e eventuais resíduos de etanol. Por fim, transferiu-se a coluna para um novo tubo de *ependorf* de 1,5 mL. Adicionou-se cuidadosamente 40  $\mu$ L de água esterilizada, previamente aquecida a aproximadamente 65°C, directamente no centro da matriz de sílica da coluna, guardou-se cinco minutos à temperatura ambiente,

e centrifugou-se à velocidade máxima durante dois minutos. Conservou-se o DNA eluído e purificado a -20°C para posterior sequenciação.

#### 2.4.4. Sequenciação directa e análise das sequências

Os produtos de PCR, dos genes CYB e DHPS, uma vez purificados, foram enviados para a Macrogen Inc. que efectuou a reacção de sequenciação directa, com o auxílio de um sequenciador automático Applied Biosystems 3730/3730XL (Applied Biosystems), que consiste num sistema automatizado de electroforese de capilares, utilizado para a análise de fragmentos de DNA previamente marcados. Cada produto foi submetido a duas reacções de sequenciação para assegurar que a cadeia dupla do fragmento de interesse fosse correctamente sequenciada em ambos os sentidos. O resultado consistiu na formação de duas sequências para cada produto – sequência *forward* e *reverse* – formadas a partir de oligonucleótidos iniciadores específicos.

A análise simultânea das sequências *forward* e *reverse*, de cada produto, iniciou-se através da utilização do programa bioinformático *Multiple sequence alignment* (MultAlin) disponível *on-line* em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, de forma a proceder ao alinhamento das sequências e adquirir a sequência consenso do fragmento. Paralelamente, cada sequência foi analisada no programa ChromasPro versão 1.6, para a verificação da qualidade da sequenciação através da observação e análise dos cromatogramas de cada uma das sequências. Cada sequência consenso obtida foi então comparada com sequências publicadas, disponíveis na base de dados do *GenBank*, com o auxílio do programa bioinformático *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), disponível *on-line* em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, com a finalidade de identificar possíveis polimorfismos.

As sequências provenientes da amplificação pela PCR do gene CYB foram alinhadas através do MultAlin, e comparadas com as sequências nucleotídicas publicadas do gene CYB de *P. jirovecii* (sequências disponíveis no *GenBank* pelos números de acesso (AN. – *Accession Number*): EU979567.1; EU979568.1; AF074871.1; AF321304.1; AF320346.1; AF320345.1; AF320344.1; AF320343.1; AF320342.1; AF320341.1). As sequências obtidas após amplificação do gene DHPS pela PCR foram alinhadas e comparadas com as sequências nucleotídicas publicadas do

gene DHPS de *P. jirovecii* (sequências disponíveis no *GenBank* pelos AN.: JX101868.1; JX101869.1; U66282.1; U66280.1; U66278.1; U66281.1; U66279.1; GU479994.1; GU479992.1; AJ746341.1; GU479993.1; AM404075.1; AJ586567.1).

## 2.5. Genotipagem *multilocus* – metodologia MPCR/SBE

Após selecção dos polimorfismos com interesse, SNPs anteriormente associados com características epidemiológicas da infecção e que são frequentemente detectados em populações semelhantes à deste estudo (ver secção “4.2. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos” no capítulo “4. Discussão e Conclusões”), iniciou-se a análise genotípica através de uma abordagem *multilocus* para a caracterização dos SNPs – *mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171* – presentes nos genes mtLSU rRNA, SOD e DHPS (**Quadro VI**).

Para o efeito, foi amplificada a porção de cada um dos três marcadores genéticos que flanqueia a região polimórfica pretendida, através da metodologia de PCR de alto rendimento – MPCR, seguida pela genotipagem dos cinco SNPs, através da tecnologia genotípica de elevada sensibilidade – a técnica SBE.

**Quadro VI.** Representação dos três *loci* em estudo, bem como dos respectivos SNPs de interesse, as suas posições nucleotídicas (**PN**) e as possíveis identidades nucleotídicas (**IN**) descritas até à data.

<i>Locus</i>	SNP	PN	IN	Descrito pela primeira vez por:
mtLSU rRNA	<i>mt85</i>	85	C	Sinclair <i>et al.</i> 1991
			A	Wakefield <i>et al.</i> 1992
			T	Lee <i>et al.</i> 1993
SOD	<i>SOD110</i>	110	C	Denis <i>et al.</i> 2000
			T	
	<i>SOD215</i>	215	C	Denis <i>et al.</i> 2000
			T	
DHPS	<i>DHPS165</i>	165	A	Lane <i>et al.</i> 1997
			G	
	<i>DHPS171</i>	171	C	Lane <i>et al.</i> 1997
			T	

A técnica de MPCR utilizada no decorrer do presente estudo, é uma metodologia correntemente aplicada na investigação e no diagnóstico laboratorial desde a sua primeira descrição em 1988 (Chamberlain *et al.* 1988), que se rege pelos princípios básicos da técnica de PCR convencional, sendo uma variante, na qual dois ou mais *loci* podem ser amplificados em simultâneo, através da inclusão de pares de *primers* específicos (Henegariu *et al.* 1997; Elnifro *et al.* 2000; Kapley *et al.* 2000; Markoulatos *et al.* 2002).

A possibilidade de obtenção de várias amplicões genéticas, pertencentes a diferentes regiões genómicas, em apenas uma reacção, demonstrou que a MPCR pode ser de grande utilidade em diversas áreas de análise de DNA, incluindo o estudo de polimorfismos (Henegariu *et al.* 1997; Elnifro *et al.* 2000; Kapley *et al.* 2000; Markoulatos *et al.* 2002), o que facilitou o desenvolvimento de tecnologias para a genotipagem de SNPs e o seu estudo genético *multiplex* (Syvanen 2001; Faber *et al.* 2005).

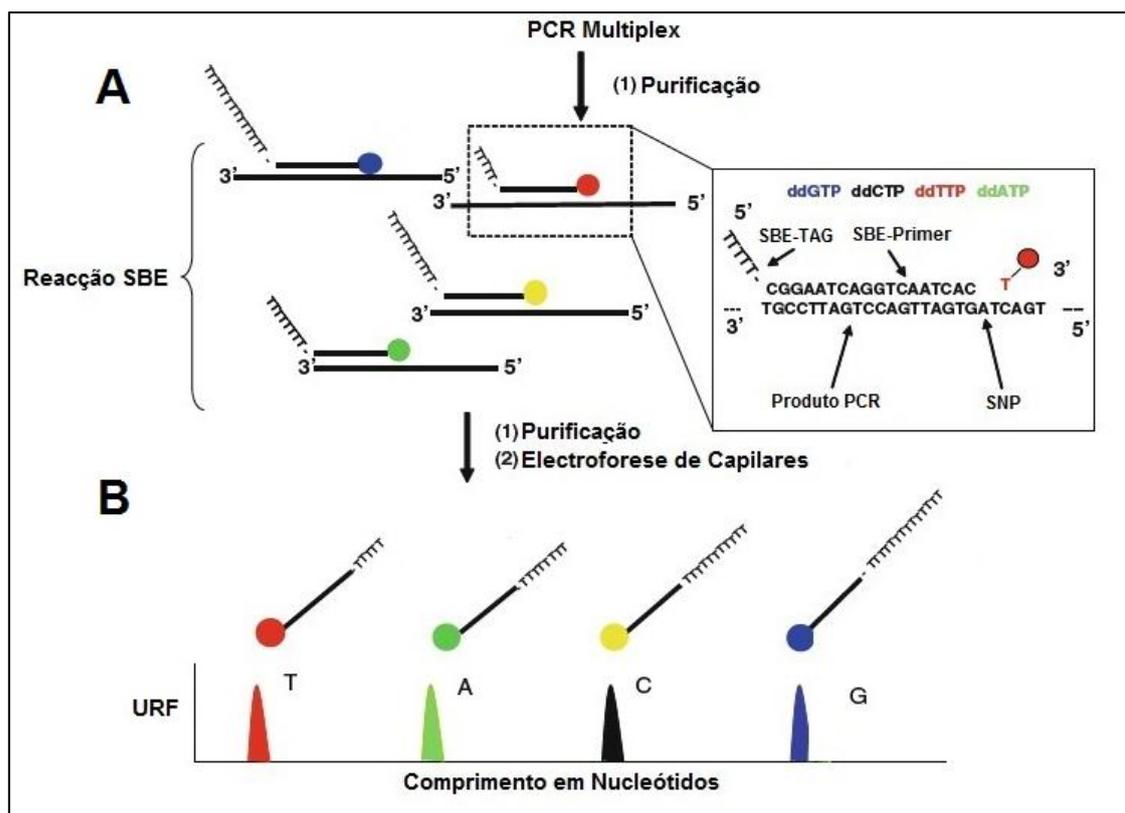
A técnica de SBE, metodologia robusta e de alto rendimento para a genotipagem de polimorfismos, encontra-se bem adaptada para este tipo de estudos. Precedida pela amplificação de DNA genómico de interesse, num formato *multiplex*, permite a genotipagem de vários SNPs em simultâneo, através da formação de produtos específicos, que podem ser identificados pela utilização de sistemas de detecção adequados e bem caracterizados (Hirschhorn *et al.* 2000; Syvänen 2001; Chen & Sullivan 2003; Faber *et al.* 2005).

Nesta abordagem genotípica, oligonucleótidos são especificamente concebidos para hibridarem com a sequência alvo, na região localizada imediatamente antes da base nucleotídica polimórfica de interesse, numa orientação 5'→3', deixando uma extremidade 3' livre (**Figura 13.A**) (Syvanen 2001; Chen & Sullivan 2003; Faber *et al.* 2005; Podini & Vallone 2009). Estes *primers*, num ensaio SBE em formato *multiplex* (MPCR/SBE), necessitam de ser acoplados a uma sonda TAG, caracterizada pela adição de uma cauda de sequência não complementar à região de interesse, na extremidade 5' de cada *primer* (**Figura 13.A**) (Chen & Sullivan 2003; Faber *et al.* 2005; Podini & Vallone 2009). Cada TAG-Primer SBE é normalmente diferenciado pelo seu tamanho,

que varia em poucos nucleótidos, de modo a permitir uma correcta análise dos resultados (**Figura 13.B**) (Chen & Sullivan 2003; Podini & Vallone 2009).

Esta técnica baseia-se nos conceitos básico da síntese de DNA, ao utilizar a propriedade de incorporação de nucleótidos com elevada precisão, da enzima DNA polimerase (Kwok 2000, 2001; Syvanen 2001; Chen & Sullivan 2003). Durante a reacção, a extensão de uma única base, a partir do TAG-*Primer* SBE hibridado com a sequência alvo, exactamente no sítio do SNP, ocorre pela actividade da DNA polimerase, na presença de dNTPs diferencialmente marcados, e que não possuem o grupo 3-hidroxilo – dideoxirribonucleótidos trifosfatados (ddNTPs – *dideoxyribonucleotide triphosphates*), complementares ao nucleótido encontrado na posição do SNP. A ausência do grupo OH na extremidade 3' do ddNTP incorporado impede o seguimento da polimerização da cadeia de DNA e o produto SBE é formado com a adição de apenas um nucleótido, exactamente na localização do SNP. (Syvanen 2001; Chen & Sullivan 2003; Faber *et al.* 2005)

A identificação do produto SBE formado é revelada pelo tamanho do TAG-*Primer* SBE e pela natureza do ddNTP incorporado, reconhecida através dos marcadores de fluorescência, fluoróforos específicos de cada ddNTP. Esta identificação pode ser efectuada com o auxílio dum aparelho de electroforese de capilares, permitindo assim a determinação do genótipo (**Figura 13.B**) (Chen & Sullivan 2003; Faber *et al.* 2005; Podini & Vallone 2009).



**Figura 13.** Ilustração da metodologia MPCR/SBE. URF – Unidades relativa de fluorescência (do inglês *Relative Fluorescent Units*) (adaptado de Podini & Vallone 2009).

### 2.5.1. Amplificação pela MPCR

Para a amplificação simultânea dos três fragmentos correspondentes aos genes mtLSU rRNA, SOD e DHPS, que flaqueiam os SNPS relevantes para este estudo, foram seleccionados três pares de *primers* específicos (**Quadro VII**) que dão origem a produtos de amplificação que variavam entre os 240 pb e os 448 pb. À excepção dos pares de *primers* PAZ 102-X – PAZ102-E (**Quadro I**) e SODFw2 – SODRw3 (**Quadro VIII**), previamente descritos (Wakefield 1996; Tsolaki *et al.* 1998; Matos *et al.* 2001; Esteves *et al.* 2010a), o par de oligonucleotidos iniciadores, DHPSFw1 – DHPSRw1 (**Quadro IV**), foi desenhado a partir do programa bioinformático Primer3, conforme descrito na secção “2.4.2. Amplificação dos *loci* CYB e DHPS pela PCR”, sintetizado e obtido comercialmente (MWG Biotech).

**Quadro VII.** *Primers* utilizados para a amplificação por MPCR dos três *loci* de interesse polimórfico (mtLSU rRNA, SOD e DHPS), bem como as sequências nucleotídicas utilizadas como TAG-*Primer* SBE para a sequenciação por SBE e genotipagem dos cinco SNPs considerados como os mais relevantes (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*).

<i>Locus</i>	SNPs	MPCR <i>primers</i> (5'→3')	Produto (pb)	TAG- <i>Primer</i> SBE (5'→3')	Tamanho (pb)
mtLSU rRNA	<i>mt85</i>	PAZ 102-X (Forward) - GTGAAATACAAATCGGACTAGG	304	<u>GTTGTGCTGAATTAAGCGAATACCGTTGGCAAATTGTT</u> <u>TATTCCTCT</u>	47
		PAZ 102-E (Reverse) - GATGGCTGTTTCC AAGCCCA			
SOD	<i>SOD110</i>	SODFw2 (Forward) - GGGTTTAATTAGTC TTTT TAGGCAC	448	<u>GATGTTGCTGGCTCGATGCAAAATA CACGAAGGAGT</u> <u>TAGCTGATGCGAGGTAATACTTTTCTTTTGTAAAG</u>	75
	<i>SOD215</i>	SODRw3 (Reverse) - CACTTCC TTGAATCCCAGACAA			
DHPS	<i>DHPS165</i>	DHPSFw1 (Forward) - CGATGGGGTGTTCATTCATATG	240	<u>GGATAAATA TCTAACA CCGTGC GTTGACTATTATTG</u> <u>ATATTGGTGGCAGTCT</u>	55
	<i>DHPS171</i>	DHPSRw1 (Reverse) - GCCTTAATTGCTTGTCTGCAACC			

\*S - isosina

**Quadro VIII.** Características do par de *primers* SODFw2 e SODRw3 utilizado para o estudo *multiplex*. O par de *primers* foi descrito pela primeira vez por Esteves *et al.* 2010a.

<i>Locus</i>	<i>Primers</i>	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	T <sub>m</sub> * (°C)	% GC	Produto (pb)
SOD	SODFw2	GGGTTTAATTAGTCTTTT TAGGCAC	25	55.1	36	448
	SODRw3	CACTTCCTTGAATCCCAGACAA	22	57.8	45	

\*A temperatura de desnaturação foi calculada com o auxílio do programa Primer Express 3.0.

Numa primeira análise os *loci* de interesse foram amplificados separadamente, de forma a verificar a eficiência dos pares de oligonucleótidos seleccionados. Para o efeito, três reacções de PCR foram efectuadas paralelamente com um volume final de 25 µL, contendo 5 µL da amostra de DNA, 1,5X tampão de reacção (75 mM KCl, 15 mM Tris-HCl [pH 8.3]) (Applied Biosystems), 0,5 mM de cada dNTP (Applied Biosystems), 3 U de Ampli TAQ GOLD (Applied Biosystems), 0,01 µg/µL de BSA (SIGMA), 5% de dimetilsulfóxido (DMSO – *dimethyl sulfoxide*) (SIGMA) e 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems). Em cada uma das reacções foi adicionado 0,7 µM de cada par de *primers* específicos (MWG Biotech). Assim, para a reacção I (amplificação pela PCR da região genómica mtLSU rRNA de 304 pb) utilizou-se os *primers* PAZ102-X e PAZ 102-E; para a reacção II (amplificação pela PCR da região genómica do *locus* SOD com 448 pb) utilizou-se os *primers* SODFw2 e SODRw3; e por fim, para a reacção III (amplificação pela PCR de uma região do gene DHPS com 240 pb) utilizou-se os *primers* DHPSFw1 e DHPSRw1. O ciclo térmico de PCR foi iniciado através de uma desnaturação inicial a 95°C, 10 minutos, seguido por 55 ciclos compreendidos por uma desnaturação a 95°C, 1 minuto; ligação a 60°C, 1 minuto; e extensão de 72°C, 10 minutos; finalizando com uma extensão final de 72°C, 10 minutos.

De seguida, realizaram-se as etapas de optimização da MPCR para a amplificação simultânea dos três produtos de interesse. Os programas de PCR utilizados neste processo de optimização encontram-se enunciados por ordem de utilização no **Quadro IX**, as condições térmicas iniciais utilizadas foram as mesmas efectuadas para as reacções de amplificação de cada *loci* pela PCR simples (**Quadro IX. Programa A**). O Programa C apresenta as condições térmicas cíclicas optimizadas para o protocolo MPCR implementado neste estudo (**Quadro IX. Programa C**).

Cada ensaio de reacção foi efectuado, para cada amostra, com 1,5X tampão de reacção (75 mM KCl, 15 mM Tris-HCl [pH 8.3]) (Applied Biosystems), 2 mM de dNTPs (0,5 mM de cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP) (Applied Biosystems), 3 U de Ampli TAQ GOLD (Applied Biosystems), 0,01 µg/µL de BSA, 5% de DMSO e 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems). Sendo que, a concentração final dos *primers* utilizada (MWG Biotech), otimizada de forma a amplificar o fragmento pretendido, foi de 0,5 µM (para os *primers* PAZ 102-X e PAZ 102-E), 1,2 µM (para os *primers* SODFw2, SODRw3) e 0,7 µM (para os *primers* DHPSFw1 e DHPSRw1), seguido pela adição de 4 µL de DNA genómico e perfazendo o volume com água destilada estéril. As condições óptimas de cada reacção foram verificadas pela utilização de controlos positivos (suspensão de amostra de *P. jirovecii* conhecida) e negativos (com todos os componentes reaccionais menos o DNA molde).

**Quadro IX.** Programas utilizados para a optimização da MPCR

	<b>Programa A</b>	<b>Programa B</b>	<b>Programa C</b>
<b>Desnaturação Inicial</b>	95°C - 10 Min	95°C - 10 Min	95°C - 10 Min
<b>Desnaturação</b>	95°C - 1 Min	95°C - 1 Min	95°C - 1 Min
<b>Ligação</b>	<b>60°C</b> - 1 Min	<b>59°C</b> - 1 Min	<b>58°C</b> - 1 Min
<b>Extensão</b>	72°C - 1 Min	72°C - 1 Min	72°C - 1 Min
	55 Ciclos	55 Ciclos	55 Ciclos
<b>Extensão Final</b>	72°C - 10 Min	72°C - 10 Min	72°C - 10 Min

A negrito encontram-se as diferenças entre cada um dos programas.

Com o objectivo de avaliar os resultados da reacção de MPCR, os produtos de amplificação foram separados por electroforese em gel de agarose (1,5%), tal como descrito na secção “2.3.2.2. Amplificação do *locus* mtLSU rRNA pela *nested*-PCR”. Após análise dos fragmentos e do registo das imagens, as amostras que apresentavam os três fragmentos de interesse foram purificadas e submetidas ao tratamento necessário para posterior sequenciação com a tecnologia SBE.

### 2.5.2. Purificação dos produtos de MPCR

A purificação dos produtos amplificados por MPCR foi realizada a partir do protocolo do kit comercial QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (Qiagen), que permite uma purificação directa, dos produtos de DNA em cadeia dupla entre 100 pb a 10 kb, removendo *primers*, dNTPs, constituintes enzimáticos e outros reagentes eventualmente em excesso, após amplificação pela MPCR. Esta metodologia utiliza como princípio, propriedades selectivas de ligação do DNA à membrana de sílica, acoplada a um sistema de coluna *spin*, que através da utilização de tampões específicos, em etapas sequenciais de lavagens, permite uma correcta remoção dos contaminantes bem como uma eficiente purificação e eluição do DNA.

As etapas efectuadas seguiram todas as instruções do fabricante, iniciando-se com a adição de cinco vezes mais de tampão PB (constituído por 5 M hidrócloro de guanidina e 30% isopropanol) para um de volume de reacção de MPCR. Esta mistura de reacção diluída, foi aplicada numa coluna QIAquick para a realização de um processo de centrifugação, na centrífuga Kubota 3000 (Kubota Corporation), a 15400 g durante um minuto, para que o DNA ficasse adsorvido à membrana de sílica pela presença de elevadas concentrações de sal. De seguida, para a etapa de lavagem, adicionou-se 750 µL de tampão de lavagem PE (10 mM Tris-HCl [pH 7,5] e 80% etanol) à coluna QIAquick e centrifugou-se a 15400 g durante um minuto, desprezando-se o filtrado. Repetiu-se o processo de centrifugação para uma correcta lavagem e remoção residual de tampão PE.

A eluição do DNA foi efectuada pela adição de 30 µL de tampão EB (10 mM Tris-HCl [pH 8.5]), directamente no centro da membrana de sílica situada no interior da coluna, e após um minuto em repouso à temperatura ambiente. A coluna, inserida num tubo de *ependorf* de 1,5 mL, foi submetida a centrifugação a 15400 g, durante um minuto. Por fim, guardou-se o DNA puro e eluído a uma temperatura de -20°C.

### 2.5.3. Sequenciação pela técnica SBE

A genotipagem dos cinco SNPs, foi efectuada com o auxílio da tecnologia SBE através do kit comercial GenomedLab<sup>™</sup> SNPstart Primer Extension kit (Beckman

Coulter®) que permite uma rápida e simples análise de múltiplas variações em sequências de DNA.

Para o efeito foram utilizados cinco TAG-Primers SBE (**Quadro VII**), cada um com especificidade para uma das cinco regiões polimórficas de interesse. Os TAG-Primer SBE utilizados para a genotipagem dos SNPs *mt85*, *SOD215* e *SOD110* foram descritos previamente por Esteves *et al.* (2011), já os TAG-Primer SBE específicos para os SNPs *DHPS165* e *DHPS171* foram cuidadosamente desenhados e elaborados durante este estudo, com o auxílio do programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), seguindo alguns parâmetros importantes.

Sucintamente, cada porção nucleotídica correspondente à sonda TAG, foi desenhada a partir de seleções do genoma do bacteriófago *lambda*, disponível no *GenBank*, para garantir a ausência de complementaridade entre as sequências TAG e regiões do genoma de *P. jirovecii*. A ausência de homologia foi confirmada através da utilização da ferramenta bioinformática BLAST. Por outro lado, cada porção nucleotídica correspondente ao primer SBE foi desenhada com a finalidade de hibridar próximo da região polimórfica de interesse, especificamente um nucleótido a montante do sítio do SNP. Por fim, o híbrido TAG-Primer SBE foi construído a partir da ligação entre cada sequência TAG a cada uma das sequências Primers SBE específicas (Faber *et al.* 2005; Podini & Vallone 2009; Esteves *et al.* 2011).

Cada TAG-Primer SBE utilizado neste estudo possui comprimentos diferentes, entre os 47 e os 82 nucleótidos, de modo a que possam ser facilmente distinguidos, através do seu tamanho (**Quadro VII**).

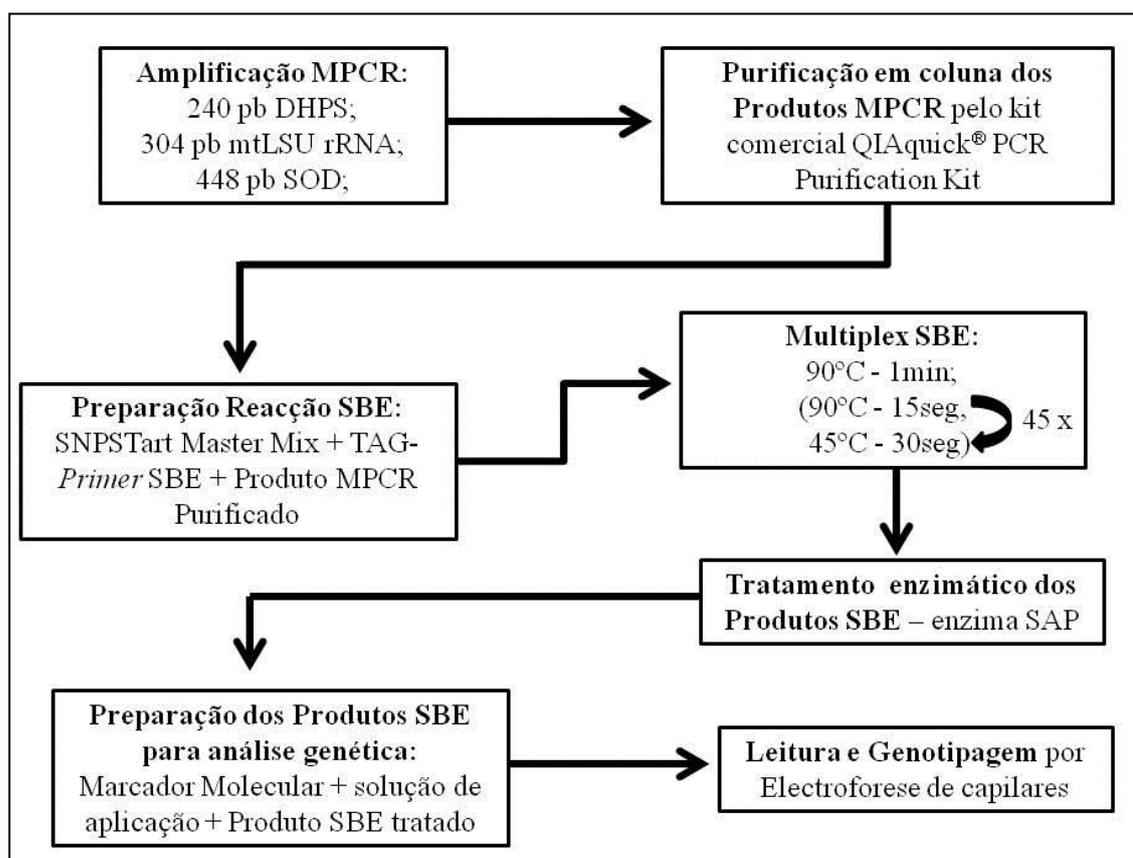
Segundo as instruções do fabricante (Beckman Coulter®), cada reacção de SBE, com um volume final de 17 µL, foi preparada em gelo, com 6 µL de mistura de reacção contendo os ddNTPs marcados (SNPStart Master Mix), 4 µL de uma mistura contendo os cinco TAG-Primer SBE (0,5 µM de TAG-Primer SBE específico para o SNP *mt85*; 1,5 µM de TAG-Primer SBE específico para o SNP *SOD110*; 1 µM de TAG-Primer SBE específico para o SNP *SOD215*; 0,5 µM de TAG-Primer SBE específico para o SNP *DHPS165* e 0,5 µM de TAG-Primer SBE específico para o SNP *DHPS171*) e 7 µL de produto de MPCR purificado (contendo os três fragmentos de interesse), previamente submetido a um choque térmico (incubação no *Block Heater* (Stuart

Scientific) a 95°C – 10 minutos, seguido de arrefecimento a 4°C), de modo a facilitar o processo de desnaturação da cadeia de DNA.

O programa térmico cíclico das reacções, realizadas no termociclador *TI Thermocycler* (Biometra®), consistiu numa desnaturação inicial durante um minuto a 90°C, seguido por 45 ciclos de 90°C – 15 segundos (para o processo de desnaturação) e 45°C – 30 segundos (para a ligação eficiente dos TAG-*Primer* SBE, a montante de cada região polimórfica específica, e incorporação do ddNTP, complementar ao SNP). Os produtos SBE resultantes foram incubados com 0.1 U/ $\mu$ L de enzima fosfatase alcalina (SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Takara Bio Inc.), diluída com o respectivo tampão enzimático, a 37°C, durante 30 minutos, para uma correcta inactivação dos ddNTPs em excesso, através da desfosforilação do grupo fosfato da extremidade 5', seguido por uma inactivação enzimática, por calor, a 65°C, durante 15 minutos.

De seguida, os produtos SBE tratados foram preparados para a análise genética efectuada no sistema automatizado CEQ 8000-XL (Beckman Coulter®) de electroforese capilar. Desta forma, em 3  $\mu$ L de cada produto SBE purificado, após tratamento com a enzima SAP, foi adicionado 0,5  $\mu$ L de marcador molecular – *Size Standard 80* e 39  $\mu$ L de solução de aplicação, fornecidos pelo fabricante (Beckman Coulter®). A leitura da sequenciação de cada reacção foi efectuada após adição da mistura referida acima, num poço de uma placa de leitura apropriada, seguida pela adição de uma gota de glicerol, em cada poço. Por fim, e após a introdução da placa no aparelho CEQ 8000-XL, a sequenciação pela SBE ocorreu através do programa optimizado, referido pelo fabricante (Programa SNP-1, Beckman Coulter®). Cada ensaio de sequenciação foi efectuada com um controlo positivo, fornecido pelo fabricante, de modo a verificar a qualidade e funcionalidade dos constituintes do kit comercial utilizado.

A **Figura 14** sumariza as várias etapas da metodologia MPCR/SBE aplicada neste estudo *multiplex*.



**Figura 14.** Representação esquemática das etapas essenciais da metodologia MPCR/SBE.

## 2.6. Interpretação dos resultados

A genotipagem *multilocus* dos cinco SNPs relevantes, foi efectuada com o propósito de: constatar a diversidade genética existente entre os isolados de *P. jirovecii*; verificar associações estatísticas; e averiguar alguns critérios relacionados com a genética populacional desta espécie.

A **diversidade genética** foi analisada através dos resultados obtidos pela genotipagem, onde foi possível verificar a frequência dos SNPs e a identificação e prevalência de genótipos *multilocus* (MLG – *multilocus genotype*).

A **análise estatística** foi efectuada com a finalidade de constatar possíveis relações, de carácter estatístico significativo, entre as características demográficas e clínicas conhecidas da população em estudo com os SNPs, haplótipos e genótipos identificados. Sendo também verificada a existência, ou não, de prováveis relações entre os SNPs detectados, recorrendo ao programa bioinformático SNPStats disponível em: <http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>, de forma a estudar a presença de desequilíbrio de ligação (do inglês *linkage disequilibrium*) entre os SNPs.

Toda a abordagem estatística foi efectuada pelo programa informático SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 18.0 (IBM), através do teste de hipótese não-paramétrico Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), recorrendo ao teste exacto de Fisher quando necessário, utilizado para verificar associações entre variáveis qualitativas dicotómicas, com um nível de significância igual ou inferior a 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

A **análise genética** incidiu no estudo e compreensão da estrutura populacional da espécie *P. jirovecii* em Portugal.

Foi aplicado um método estatístico, o teste combinatório d1, proposto por Tibayrenc *et al.* (1990, 1991), adequado para o estudo de populações de microrganismos eucariotas. Este teste baseia-se na hipótese nula de que a população é panmítica, que a recombinação genética ocorre aleatoriamente (Tibayrenc 2003; Esteves *et al.* 2010b), permitindo, deste modo, avaliar e quantificar prováveis desvios à recombinação aleatória e analisar possíveis critérios de clonalidade (Tibayrenc *et al.* 1990; Esteves *et al.* 2010b).

A observação da presença de um MLG específico em excesso, numa amostra proveniente de determinada população é, muitas vezes, uma forte indicação para a ocorrência de recombinação não aleatória entre *loci* distintos (Tibayrenc *et al.* 1991; Tibayrenc 2003). O nível de significância estatística deste tipo de observação é avaliado pelo teste d1, onde a probabilidade  $P$ , é calculada do seguinte modo:

$$P = \sum_{i=m}^n \frac{n! x^i (1-x)^{n-i}}{i! (n-i)!},$$

onde  $x$  representa a probabilidade da presença do MLG, assumindo associações aleatórias entre os *loci*, estimada pela multiplicação da frequência observada de cada um dos *loci*;  $n$  representa o número total de isolados; e  $m$  representa o número de isolados com um determinado genótipo (Tibayrenc *et al.* 1990).

---

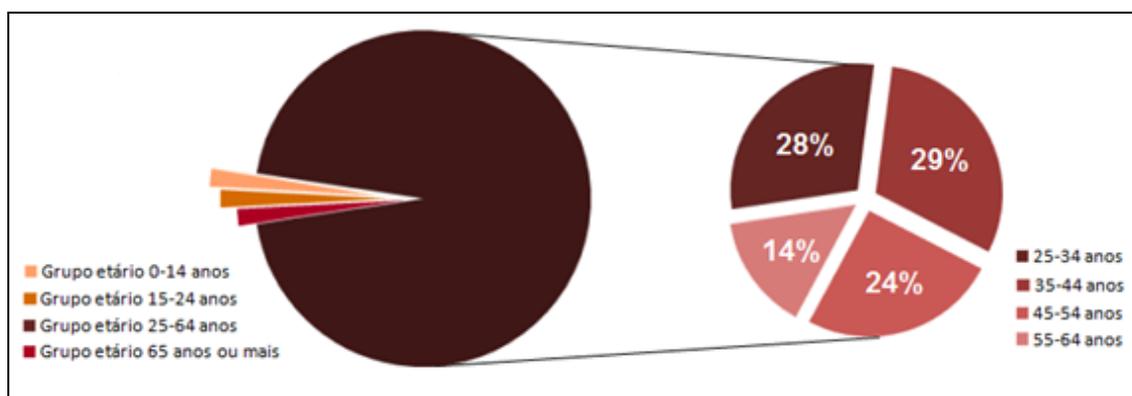
## ***RESULTADOS***

### 3.1. Características demográficas e clínicas da população em estudo

As informações epidemiológicas de cada um dos 66 indivíduos em estudo, bem como as respectivas 66 amostras de secreções pulmonares, previamente consideradas positivas para *P. jirovecii*, foram obtidas a partir de quatro instituições hospitalares, situadas no distrito de Lisboa, num período de 11 anos (2001-2012).

Constatou-se que a maioria dos doentes eram do sexo masculino (47/66; 71%) e 29% (19/66) eram do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 12 e os 65 anos. A média das idades foi de 41 anos, enquanto a mediana foi 39.

Cerca de 95% (63/66) da população era constituída por indivíduos adultos, pertencentes ao grupo etário dos 25 aos 64 anos (28% com idades compreendidas entre os 25 e os 34 anos; 29% com idades entre 35 e os 44 anos; 24% com idades entre os 45 e os 54 anos; e 14% com idades entre os 55 e os 64 anos). Verificou-se, também, que os restantes 5% (3/66) estavam distribuídos pelos outros três grupos etários formados, sendo 1/3 da população constituída por crianças (grupo etário entre os 0 e os 14 anos), 1/3 constituída por indivíduos entre os 15 e os 24 anos, e 1/3 constituída por doentes com idades superior a 65 anos (**Gráfico 1**).



**Gráfico 1.** Distribuição das idades pelos grupos etários definidos.

Estes indivíduos representavam um grupo de imunocomprometidos, constituído por doentes seropositivos para VIH (64/66; 97%) e seronegativos para VIH (2/66; 3%) com outras causas de imunodeficiência (dois doentes submetidos a terapia de imunossupressão, devido a transplante de órgão e a ocorrência de tumor).

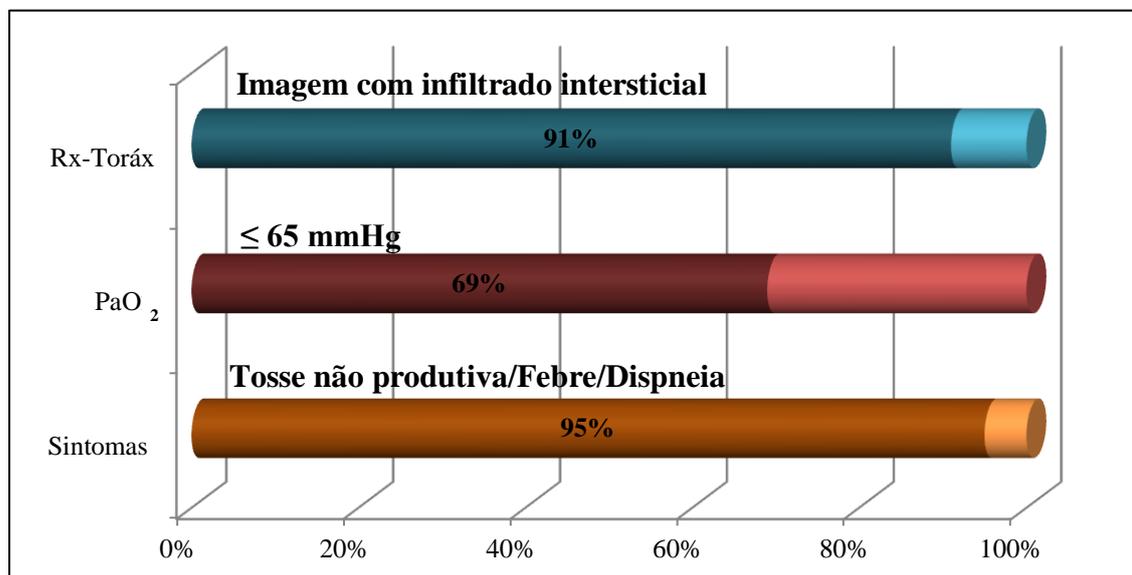
Através dos dados clínicos facultados, foi possível constatar que, apesar da apresentação clínica variar sobretudo devido ao grau de imunossupressão de cada doente, todos apresentavam manifestações clínicas pulmonares. Estas e outras informações relevantes, foram analisadas tendo em conta alguns critérios, considerados importantes para o estudo, e previamente referidos em Esteves *et al.* (2010a, 2010b, 2012). A análise efectuada de toda a informação clínica disponível encontra-se resumida no **Quadro X**.

**Quadro X.** Informações clínicas referentes aos doentes estudados.

Dados Clínicos	Número (%) de Doentes
- Diagnóstico clínico:	66
Sugestivo para a PPc	59 (89)
Não sugestivo para a PPc	7 (11)
- Contagem de células TCD4 <sup>+</sup> :	55
> 200 cél/mm <sup>3</sup>	2 (4)
200 cél/mm <sup>3</sup> ≤ X < 500 cél/mm <sup>3</sup>	20 (36)
≤ 500 cél/mm <sup>3</sup>	33 (60)
- Regime Profilático:	60
Anti-PPc instituído	9 (15)
Não instituído	51 (85)
- Regime Terapêutico:	59
Anti-PPc instituído	50 (85)
Não instituído	9 (15)
- Evolução Clínica:	46
Positiva	33 (72)
Negativa	13 (28)

Na sua grande maioria, o diagnóstico clínico era fortemente sugestivo para uma suspeita de PPc (**Quadro X**). Cerca de 89% (59/66) dos doentes apresentava um quadro clínico e radiológico sugestivo de infecção pulmonar por *P. jirovecii*, com a presença de pelo menos duas das seguintes manifestações: sintomas como tosse não produtiva, febre e/ou dispneia; baixa pressão parcial de oxigénio (inferior a 65 mmHg); e/ou radiograma do tórax com imagem compatível com um padrão característico de PPc (infiltrado

intersticial bilateral predominante na região peri-hilar), sendo a frequência destas manifestações de 95%, 69% e 91%, respectivamente (**Gráfico 2**).



**Gráfico 2.** Frequência das principais características clínicas encontradas, referentes ao quadro clínico, gasimetria e imagem radiológica dos doentes analisados neste estudo, associadas com PPC.

Foram também disponibilizados, para 55 doentes, os níveis de contagem de células TCD4<sup>+</sup> (**Quadro X**). Considerando que a probabilidade de manifestação da PPC aumenta consideravelmente quando os níveis de contagem destas células é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>, a obtenção deste parâmetro laboratorial permitiu verificar o risco de desenvolvimento da infecção por *P. jirovecii*, sendo constatado que o risco associado é baixo, moderado ou alto, quando a contagem se encontra superior a 200 células/mm<sup>3</sup>, entre 200 e 50 células/mm<sup>3</sup> ou inferior a 50 células/mm<sup>3</sup>, respectivamente. Apenas 4% (2/55) dos doentes apresentavam uma contagem superior a 200 células/mm<sup>3</sup>. Os restantes apresentavam níveis celulares iguais ou inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, dos quais 60% (33/55), apresentavam uma contagem igual ou inferior a 50 células/mm<sup>3</sup>.

Dados referentes à presença/ausência de administração de medidas profiláticas e/ou terapêuticas contra a PPC também foram considerados. De acordo com a informação médica disponibilizada para 60 dos 66 doentes (**Quadro X**), apenas 15% (9/60) foram submetidos a profilaxia anti-PPC com o fármaco TMP-SMZ, constatando que a maioria (51/60; 85%) não recebeu qualquer tipo de intervenção profilática. No

---

que diz respeito ao tratamento, em 85% (50/59) dos doentes para os quais esta informação foi cedida (**Quadro X**), verificou-se a implementação de terapêutica anti-PPc, maioritariamente através da combinação de fármacos TMP-SMZ (46/50; 92%) e sulfadiazina-pirimetamina (4/50; 8%).

Foi possível obter ainda a informação adicional sobre a evolução da situação clínica em 46 doentes submetidos ao tratamento (**Quadro X**). Em 72% (33/46) dos casos, verificou-se uma melhoria progressiva e evolução clínica positiva, provavelmente devido a uma resposta favorável à terapêutica anti-PPc aplicada, e sobrevivência de pelo menos quatro semanas depois do diagnóstico. Nos restantes 28% (13/46) a evolução clínica foi negativa. Nestes casos, ou o doente não apresentou melhorias significativas após instituição da terapêutica, apresentando uma resposta pouco favorável mesmo depois de 10 dias de tratamento, ou acabou por falecer durante o episódio clínico.

### 3.2. Diagnóstico laboratorial

A positividade das amostras (N=66) foi confirmada através do diagnóstico laboratorial efectuado pela técnica de IFI com AcM, para a identificação de formas morfológicas quísticas de *P. jirovecii*, e/ou pela técnica *nested*-PCR, após extracção de DNA, para a amplificação e detecção do gene mtLSU rRNA de *P. jirovecii*. Verificou-se que 86% (57/66) das amostras foram confirmadas como sendo positivas para *P. jirovecii* através do diagnóstico parasitológico e molecular, enquanto as restantes (9/66; 14%) amostras apenas foram confirmadas como sendo positivas para *P. jirovecii* pelo diagnóstico molecular (tendo sido, portanto, negativas pelo exame parasitológico).

Considerando os resultados obtidos pelo diagnóstico laboratorial, foi possível proceder à determinação da carga parasitária em cada uma das amostras/isolados analisados, através da informação fornecida pelo **Quadro III** (disponível na secção “2.3.3. Determinação da carga parasitária” no capítulo “2. Material e Métodos”). Deste modo, em 14% (9/66) dos isolados foi encontrada uma carga parasitária baixa, em 45% (30/66) dos isolados foi encontrada uma carga parasitária moderada e os restantes (27/66; 41%) isolados apresentavam uma carga parasitária alta.

Tendo novamente em consideração os resultados referentes ao diagnóstico laboratorial e os dados clínicos disponibilizados, foi possível verificar que, dos espécimes pulmonares analisados, 89% (59/66) considerados positivos pela IFI e/ou *nested*-PCR, com carga parasitária baixa/moderada/alta, foram provenientes de doentes com diagnóstico clínico sugestivo de PPC; 6% (4/66) considerados positivos pela IFI e *nested*-PCR, com carga parasitária moderada/alta foram obtidos a partir de doentes com diagnóstico clínico não sugestivo de PPC; e 5% (3/66), considerados negativos pela IFI e positivos pela *nested*-PCR, com carga parasitária baixa, foram provenientes de doentes com diagnóstico clínico não sugestivo de PPC. Esta descrição permitiu a formação de três grupos distintos de doentes, definidos no **Quadro XI**.

**Quadro XI.** Definição dos grupos tendo em conta os resultados obtidos laboratorialmente e o diagnóstico clínico de cada doente.

Grupo	Diagnóstico Laboratorial		Diagnóstico Clínico	Carga Parasitária	N (%)
	IFI	PCR			
A	+	+	Sugestivo de PPc	Baixa, Moderada, Alta	59 (89)
B	+	+	Não sugestivo de PPc	Moderada a Alta	4 (6)
C	-	+	Não sugestivo de PPc	Baixa	3 (5)

+: resultado positivo; -: resultado negativo; N: número de indivíduos;

Tendo em conta a informação disponibilizada no **Quadro XI**, verifica-se que o grupo A foi constituído por doentes com casos de PPc confirmada; o grupo B foi constituído por doentes com apresentação atípica de PPc, e o grupo C foi constituído por doentes colonizados por *P. jirovecii*, e que deste modo apresentam uma infecção subclínica.

### 3.3. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos

A selecção dos marcadores genéticos, com interesse epidemiológico, de entre as regiões genómicas mtLSU rRNA, SOD, CYB, DHPS e DHFR, foi baseada numa pesquisa bibliográfica sobre os cinco marcadores genéticos envolvidos, e através de um estudo genético prévio para a análise de sequências, dos genes CYB e DHPS, com o intuito de proceder à caracterização destas regiões, em alguns isolados disponibilizados para o efeito (cujos principais resultados serão descritos nesta secção).

Seleccionou-se três dos marcadores mencionados anteriormente, nomeadamente, os genes mtLSU rRNA, SOD e DHPS, devido à presença de SNPs que foram previamente considerados relevantes a nível clínico, em estudos epidemiológicos, e que apresentavam uma prevalência relativamente elevada na população alvo deste estudo, com implicações na severidade da infecção, evolução clínica, ou mesmo em fenómenos de resistência a fármacos (ver secção “4.2. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos” do capítulo “4. Discussão e Conclusões”).

#### 3.3.1. Análise e caracterização genética de isolados - *locus* CYB

Neste estudo, a análise do gene CYB foi efectuada somente em 78% (35/45) dos isolados. Nos restantes 22% (10/45) dos isolados não foi possível proceder a esta análise devido à insuficiente quantidade de DNA disponível. Estes foram submetidos a uma reacção de PCR, para a amplificação de um fragmento com 639 pb do gene CYB, onde mais de metade (25/35; 71%) foram amplificados com sucesso, e submetidos à sequenciação directa.

Os resultados obtidos por sequenciação foram cuidadosamente analisados e cada sequência consenso do gene obtida, referente a cada um dos isolados, foi comparada, com sequências do gene CYB disponíveis na base de dados do *GenBank*, de modo a serem caracterizadas.

Constatou-se a presença de sequências idênticas à sequência descrita por Walker *et al.* (1998), previamente definida pela sequência *wild-type* do gene CYB (AN. AF074872), em 52% (13/25) dos isolados. A identificação de sequências com mutações

pontuais, nomeadamente nas posições nucleotídicas 279, 516, 547, 566 e 838 do gene CYB, foi verificada em 36% (9/25) dos isolados. Três destas sequências caracterizadas apresentavam simultaneamente os polimorfismos nas posições nucleotídicas 279 e 516. Por último, em 12% (3/25) dos isolados caracterizados foi verificada a presença de sequências mistas, definidas pela presença de mais do que uma base numa mesma posição nucleotídica. Especificamente, cada um destes isolados possuíam uma combinação entre sequências do tipo *wild-type* e polimórficas, e apresentavam variações em uma de três posições nucleotídicas, nas posições 516 (C/T), 547 (C/T) ou 838 (C/T).

De entre os 25 isolados caracterizados, para a sequência nucleotídica correspondente ao gene CYB, verificou-se a presença de quatro sequências nunca antes reportadas, tendo sido por isso submetidas e registadas na base de dados do *GenBank* com os AN. JX292733, JX292734, JX292735 e JX292736 (**Figura 15**).

As novas sequências JX292733 e JX292736, com 581 pb e 598 pb respectivamente, apresentavam 99% de homologia com a sequência publicada no *GenBank* pelo AN. AF074871. A diferença está numa única variação nucleotídica encontrada, a substituição de um C para um T, na posição 547 na sequência JX292733 (**Figura 15.A**) e na posição 516 na sequência JX292736 (**Figura 15.B**).

As outras duas sequências JX292734 e JX292735 aqui caracterizadas apresentavam 99% de identidade, em 595 pb e 589 pb respectivamente, com a sequência do gene CYB disponível no *GenBank* com o AN. EU979567. As sequências JX292734 e JX292735 são distintas da sequência EU979567 na mesma região nucleotídica, mais concretamente na posição 348, devido à substituição, de um nucleótido G para um nucleótido A (**Figura 15.C** e **Figura 15.D**). A sequência JX292735 também se distingue pela presença de outra variação nucleotídica, na posição 279 (substituição de uma C para uma T) (**Figura 15.D**).

<b>A</b>	1	301	547	881	1038
AF074871	TATTTATGGA.....GCTTCTTGG.....AATCCT <b>C</b> TGG.....TTTAGACCTCT.....GGGTATTATT				
JX292733	GCITTCCTTGG.....AATCCT <b>T</b> TGG.....TTTAGACCTCT				
<b>B</b>	1	286	516	883	1038
AF074871	TATTTATGGA.....TCITTAATTAT.....TTAAT <b>C</b> TCTTT.....TTTAGACCTCTTAGTAAATT.....GTATTATT				
JX292736	ATTAT.....TTAAT <b>T</b> TCITT.....TTTAGACCTCTTA				
<b>C</b>	244	287	348	881	
EU979567	CCCAGAA.....TCTTAATTAT.....TGTGGGG <b>G</b> GC.....TTTAGACCTCTT				
JX292734	TTAT.....TGTGGGG <b>A</b> GC.....TTTAGACCTCT				
<b>D</b>	244	251	279	348	881
EU979567	CCCAGAA.....TTCTCGTTTG.....GTAGTTAT <b>C</b> T.....TGTGGGG <b>G</b> GC.....TTTACCTCTT				
JX292735	TTCTCGTTTG.....GTAGTTAT <b>T</b> T.....TGTGGGG <b>A</b> GC.....TTTACCTCT				

**Figura 15.** Alinhamento entre sequências nucleotídicas do gene *CYB*: **A.** Alinhamento entre a sequência AF074871 (*wild-type*) e a sequência JX292733. **B.** Alinhamento entre a sequência AF074871 e a sequência JX292736. **C.** Alinhamento entre a sequência EU979567e a sequência JX292734. **D.** Alinhamento entre a sequência EU979567e a sequência JX292735. As sequências JX292733-36 foram caracterizadas pela primeira vez e submetidas no *GenBank*, durante o presente estudo. Os nucleótidos idênticos estão representados pela cor cinza, e as diferenças nucleotídicas encontradas encontram-se a laranja. A numeração dada às posições nucleotídicas é referente à sequência *wild-type*.

Os alinhamentos foram efectuados através do programa MultAlin.

Através da análise e do alinhamento de sequências do gene *CYB* também foi possível verificar a presença de determinados SNPs previamente identificados em estudos de caracterização genética deste gene (Walker *et al.* 1998; Kazanjian *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002b; Esteves *et al.* 2010a, 2010b) (**Quadro XII**).

**Quadro XII.** Identificação dos SNPs encontrados nas posições nucleotídicas 279, 516, 547, 566 e 838, bem como as suas respectivas frequências, após caracterização genética de sequências do gene *CYB* em isolados de *P. jirovecii*.

Posição (identidade) nucleotídica	Número (%) dos isolados	SNPs	Frequência dos SNPs
279 (C)	22 (88)	<b><i>CYB279C</i></b>	88%
279 (C→T)	3 (12)	<i>CYB279T</i>	12%
516 (C)	19 (76)	<b><i>CYB516C</i></b>	77%
516 (C→T)	5 (20)	<i>CYB516T</i>	23%
516 (C/T)*	1 (4)		
547 (C)	22 (88)	<b><i>CYB547C</i></b>	88%
547 (C→T)	2 (8)	<i>CYB547T</i>	12%
547 (C/T)*	1 (4)		
566 (C)	24 (96)	<b><i>CYB566C</i></b>	96%
566 (C→T)	1 (4)	<i>CYB566T</i>	4%
838 (C)	23 (92)	<b><i>CYB838C</i></b>	92%
838 (C→T)	1 (4)	<i>CYB838T</i>	8%
838 (C/T)*	1 (4)		

\*Polimorfismos contabilizados duas vezes, para o cálculo da frequência, por pertencerem a isolados que contêm mais do que uma base para a mesma posição nucleotídica. Isolados com mais do que um genótipo.

A negrito encontram-se representados os SNPs característicos da sequência *wild-type* do gene *CYB*.

“→” representa a variação nucleotídica encontrada. “/” indica a existência de duas entidades nucleotídicas na mesma posição.

Os SNPs mais prevalentes são aqueles característicos da sequência *wild-type* do gene *CYB*, com frequências que variam entre 77% (para o SNP *CYB516C*) a 96% (para o SNP *CYB566C*).

A maioria das variações nucleotídicas encontradas compreende polimorfismos sinónimos, de entre os quais, o SNP *CYB516T* é o mais representativo com uma frequência de 23%, seguindo pelos SNPs *CYB279T* e *CYB547T*, ambos com uma frequência de 12%. Também foi verificada a presença de variações que resultam em SNPs não-sinónimos, nomeadamente a variação nucleotídica C→T encontrada nas posições 566 e 838. A presença do SNP *CYB566T* conduz a uma alteração do aminoácido Ser, no codão 189, para o aminoácido Leu; e a presença do SNP *CYB838T* resulta na substituição do aminoácido Leu para Phe no codão 280. No entanto, estes SNPs, *CYB566T* e *CYB838T*, foram os menos representativos entre os isolados caracterizados, com frequências relativamente baixas, entre os 4% e os 8%, respectivamente.

### 3.3.2. Análise e caracterização genética de isolados - locus DHPS

O gene DHPS foi amplificado pela PCR em 84% (38/45) dos isolados, sendo o fragmento do gene amplificado com 240 pb, posteriormente sequenciado e analisado com sucesso.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências do gene DHPS de *P. jirovecii* disponíveis no *GenBank*, com o auxílio da ferramenta bioinformática BLAST, de forma a verificar a existência de regiões similares e a presença de eventuais polimorfismos. Através desta comparação, foi possível verificar que a totalidade das sequências analisadas foram 100% semelhantes às sequências encontradas na base de dados.

Constatou-se que a maioria das sequências obtidas neste estudo (33/38; 87%), eram homólogas à sequência *wild-type* do gene DHPS descrita por Lane *et al.* (1997) (AN. U66282), e que 8% (3/38) dos isolados caracterizados apresentavam mutações em duas regiões nucleotídicas, na posição 165 e 171, considerados duplos mutantes. Os restantes isolados (2/38; 5%) apresentavam ambos os genótipos referidos anteriormente, sequência *wild-type* e variação nucleotídica nas posições 165 (A/G) e 171 (C/T), sendo portanto, considerados como isolados com sequências mistas, representativas de populações heterogêneas de microrganismos.

Não foram observadas quaisquer outras variações nucleotídicas.

No **Quadro XIII** encontram-se representados os SNPs identificados neste estudo, previamente descritos por Lane *et al.* (1997), após a análise e alinhamento das sequências do gene DHPS.

**Quadro XIII.** Identificação dos SNPs encontrados nas posições nucleotídicas 165 e 171, bem como as suas respectivas frequências, após caracterização genética de sequências do gene DHPS em isolados de *P. jirovecii*.

Posição (identidade) nucleotídica	Número (%) dos isolados	SNPs	Frequência dos SNPs
165 (A)	33 (87)	<i><b>DHPS165A</b></i>	87%
165 (A→G)	3 (8)	<i>DHPS165G</i>	13%
165 (A/G)*	2 (5)		
171 (C)	33 (87)	<i><b>DHPS171C</b></i>	87%
171 (C→T)	3 (8)	<i>DHPS171T</i>	13%
171 (C/T)*	2 (5)		

\*Polimorfismos contabilizados duas vezes, para o cálculo da frequência, por pertencerem a isolados que contêm mais do que uma base para a mesma posição nucleotídica. Isolados com mais do que um genótipo.

A negrito encontram-se representados os SNPs característicos da sequência *wild-type* do gene DHPS.

“→” representa a variação nucleotídica encontrada. “/” indica a existência de duas entidades nucleotídicas na mesma posição.

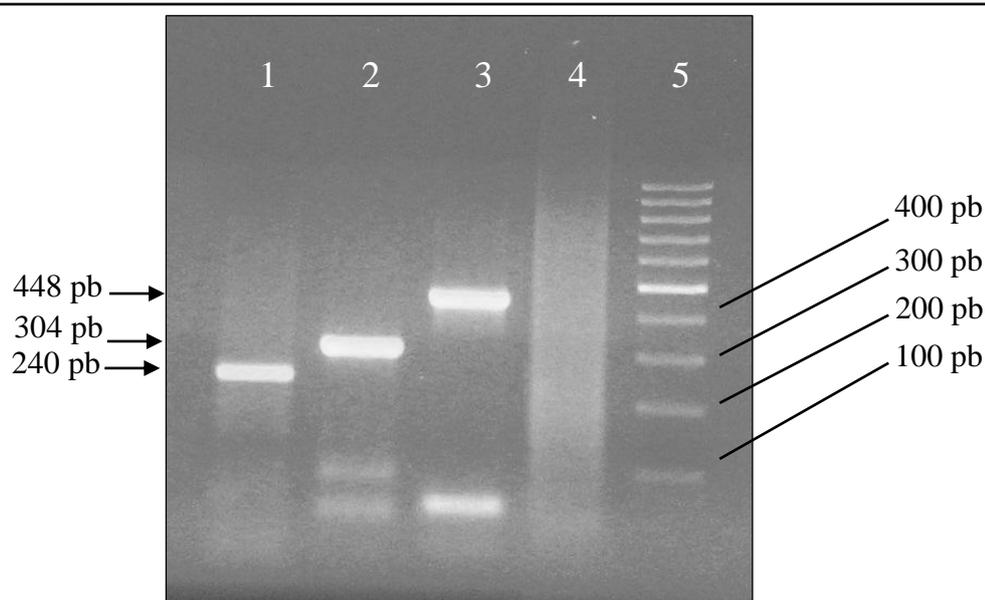
Como indicado no quadro acima, os SNPs *DHPS165A* e *DHPS171C*, característicos de sequências *wild-type* do gene DHPS, são os mais representativos entre os isolados, com uma frequência de 87% (**Quadro XIII**). As únicas variações encontradas, caracterizavam-se por serem polimorfismos não sinónimos, e situam-se nas posições nucleotídicas 165 (A → G) e 171 (C → T), que resultam numa alteração aminoacídica, de uma Thr para Ala na posição correspondente ao codão 55 e numa alteração aminoacídica, de uma Pro para uma Ser referente ao codão 57, respectivamente. Estes SNPs, *DHPS165G* e *DHPS171T*, apresentavam uma prevalência entre os isolados de 13% (**Quadro XIII**).

### 3.4. Amplificação pela MPCR

Neste estudo, foi otimizado um protocolo para a amplificação simultânea de três fragmentos de DNA, provenientes de três regiões genómicas distintas de *P. jirovecii* (mtLSU rRNA, SOD e DHPS), consideradas como marcadores genéticos da infecção, através da utilização da técnica de MPCR de alto rendimento.

A validação deste protocolo iniciou-se com a escolha dos três conjuntos de *primers* (PAZ 102-X – PAZ 102-E; SODFw2 – SODRw3; DHPSFw1 – DHPSRw1) específicos para a amplificação de cada uma das regiões genómicas de interesse. As sequências de cada um dos seis *primers* foram analisadas no programa bioinformático OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) onde foi constatado a baixa complementariedade existente entre cada sequência de *primers* bem como a reduzida probabilidade de formação de estruturas secundárias (*hairpin*) e dímeros de *primers*. Para a verificação da eficiência de amplificação, cada par de *primers* foi testado em três reacções de PCR simples, efectuadas paralelamente e nas mesmas condições referidas anteriormente na secção “2.5.1. Amplificação pela MPCR” no capítulo “2. Material e Métodos”, para a amplificação dos três genes de interesse individualmente.

A **Figura 16** representa os resultados obtidos, por electroforese em gel de agarose, onde foi possível comprovar a eficiência dos três pares de *primers* através da visualização dos fragmentos com tamanhos específicos, nomeadamente, 240 pb para a amplificação do gene DHPS com o par de *primers* DHPSFw1 – DHPSRw1, 304 pb para a amplificação do gene mtLSU rRNA com o par de *primers* PAZ 102-X – PAZ 102-E, e 448 pb para a amplificação do gene SOD com o par de *primers* SODFw2 – SODRw3.

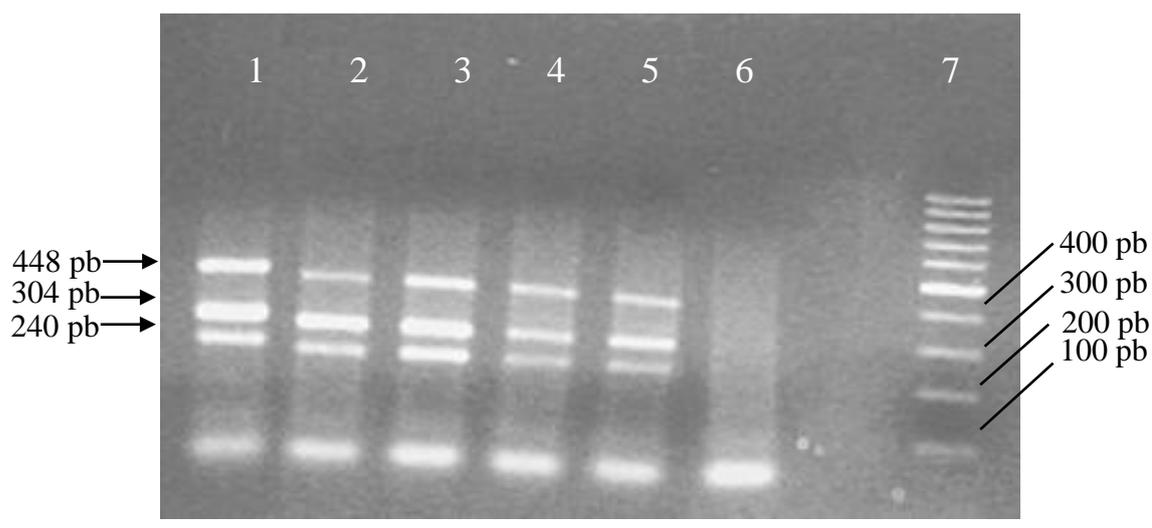


**Figura 16.** Electroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação pela PCR dos genes DHPS, mtLSU rRNA e SOD em isolados de *P. jirovecii*. Poço 1: Gene DHPS (240 pb); Poço2: Gene mtLSU rRNA (304 pb); Poço3: Gene SOD (448 pb); Poço 4: Controlo negativo; Poço 5: Marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler™ - Fermentas).

Após verificação e análise dos pares de *primers* seleccionados, foi possível iniciar a optimização do protocolo de MPCR. Numa primeira fase, um ciclo de MPCR foi implementado com as mesmas condições de reacção utilizadas para os PCR simples, e com concentrações equimolares dos pares de *primers*. A análise dos resultados sugeriu alterações nas condições cíclicas utilizadas e a um ajuste na concentração dos *primers*, que conduziu ao protocolo optimizado, descrito na secção “2.5.1. Amplificação pela MPCR” e no “**Quadro IX.Programa C**” no capítulo “2. Material e Métodos”. Esta optimização dependeu fortemente da temperatura de ligação utilizada. A diminuição de 2°C (de 60°C para 58°C) facilitou a amplificação dos três fragmentos simultaneamente e, como esperado, os produtos com 240 pb, 304 pb e 448 pb, que correspondem aos fragmentos dos genes DHPS, mtLSU rRNA e SOD, respectivamente foram amplificados, com sucesso, nos 66 isolados submetidos ao protocolo MPCR. O ajuste na concentração dos *primers* (de 0,7 µM para 0,5 µM para o par PAZ 102-X – PAZ 102-E; de 0,7 µM para 1,2 µM para o par SODFw2 – SODRw3; e de 0,7 µM para o par DHPSFw1 – DHPSRw1) foi efectuado principalmente para evitar a amplificação

preferencial de fragmentos, o que também resultou numa diminuição de formação de produtos pouco visíveis e com fraca intensidade.

Na **Figura 17** encontra-se representado um resultado da amplificação simultânea dos genes DHPS, mtLSU rRNA e SOD pelo protocolo MPCR utilizado.



**Figura 17.** Electroforese em gel de agarose (1.5%) dos produtos de amplificação multiplex dos genes DHPS, mtLSU rRNA e SOD em isolados de *P. jirovecii*. Poço 1: Controlo positivo; Poço 2-5: MPCR dos genes DHPS (240 pb), mtLSU rRNA (304 pb) e SOD (448 pb). Poço 6: Controlo negativo; Poço 7: Marcador de peso molecular de 100 pb (Gene Ruler™ - Fermentas).

### 3.5. Genotipagem pela técnica SBE

Para a genotipagem dos cinco SNPs seleccionados (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*), previamente associados com parâmetros da infecção por *P. jirovecii*, foi necessário proceder à optimização da técnica SBE num formato *multiplex*, que possibilitasse a sequenciação simultânea dos polimorfismos de interesse.

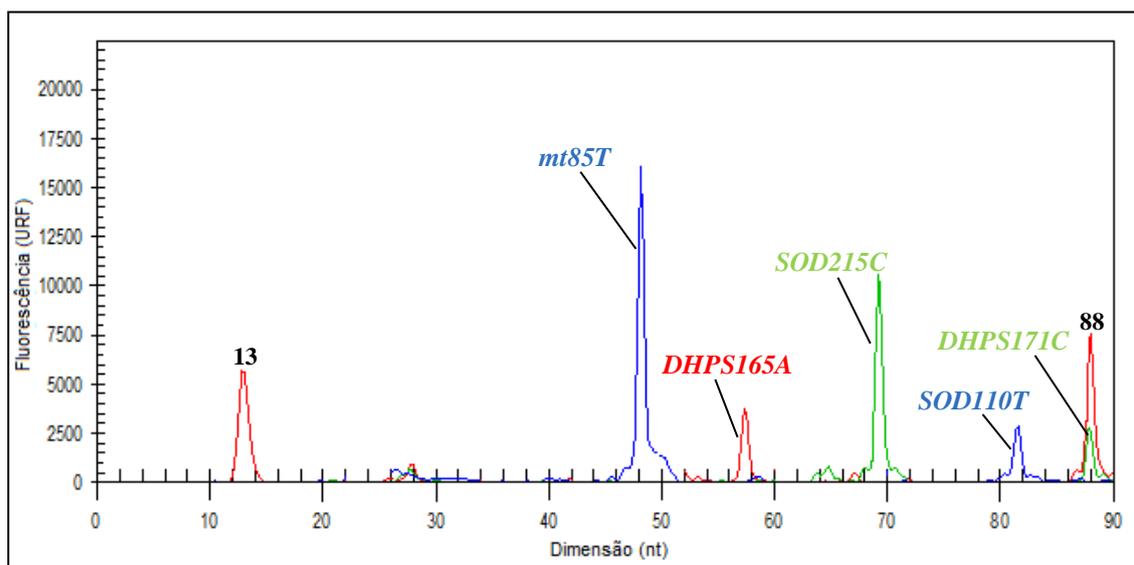
A utilização desta técnica foi dirigida aos produtos de MPCR, obtidos após amplificação dos três *loci* (mtLSU rRNA, SOD e DHPS) do genoma de *P. jirovecii*, que flaqueiam os SNPs seleccionados.

O protocolo do ensaio SBE, em formato *multiplex*, para este estudo, começou a ser desenvolvido com a aquisição de cinco TAG-Primer SBE escolhidos especificamente através de alguns critérios, já referidos na secção “2.5.4. Sequenciação pela SBE” no capítulo “2. Material e Métodos”. Para a optimização do ensaio de reacção SBE, foi crucial que cada TAG-Primer SBE utilizado estivesse na sua concentração óptima. Os melhores resultados foram obtidos para concentrações de TAG-Primer SBE entre os 0,5  $\mu\text{M}$  e 1,5  $\mu\text{M}$ , seguindo o programa térmico cíclico indicado pelo fabricante do kit comercial GenomedLab™ SNPStart Primer Extension kit (Beckman Coulter®). A optimização do ensaio permitiu garantir a formação de produtos SBE com óptima qualidade e com boa intensidade de fluorescência, minimizando a formação de produtos inespecíficos.

Os resultados foram visualizados através da técnica de electroforese capilar, com o auxílio de um sequenciador automático, onde foi possível detectar cinco picos distintos correspondentes a cada um dos produtos SBE formados. Cada produto teve origem a partir de um TAG-Primer SBE específico e da incorporação de um ddNTP complementar e diferencialmente marcado, na posição nucleotídica do SNP. Os cinco picos detectados, por electroforese capilar, identificam os cinco SNPs em estudo, e representam a dimensão dos diferentes TAG-Primer SBE utilizados e as diferentes fluorescências emitidas pela incorporação do ddNTP marcado com fluoróforos específicos. Deste modo, a detecção de picos com dimensões próximas de 47 nucleótidos, com fluorescência amarela (representada pela cor preta), vermelha ou azul, correspondiam aos SNPs *mt85C*, *mt85A* ou *mt85T*, respectivamente; a detecção de picos com dimensões próximas de 55 nucleótidos, com fluorescência vermelha ou verde,

correspondiam aos SNPs *DHPS165A* ou *DHPS165G*, respectivamente; a detecção de picos com dimensões próximas de 64 nucleótidos, com fluorescência vermelha ou verde, correspondiam aos SNPs *SOD215T* ou *SOD215C* respectivamente; a identificação de picos com dimensões próximas de 75 nucleótidos, com fluorescência amarela (representada pela cor preta) ou azul, correspondiam aos SNPs *SOD110C* ou *SOD110T* respectivamente; e a identificação de picos com dimensões próximas de 82 nucleótidos, com fluorescência verde ou vermelha, correspondiam aos SNPs *DHPS171C* ou *DHPS171T* respectivamente.

A **Figura 18** representa um resultado característico obtido através da técnica de genotipagem SBE em formato *multiplex*, por electroforese capilar, aplicada neste estudo.



**Figura 18.** Cromatograma obtido por sequenciação SBE através de electroforese capilar, para a genotipagem *multilocus* dos SNPs *mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*, de um isolado de *P. jirovecii*. Os picos de fluorescência correspondem aos SNPs *mt85T*, *DHPS165A*, *SOD215C*, *SOD110T* e *DHPS171C*. Os picos de dimensões nucleotídicas de 13 e 88 nucleótidos, com fluorescência vermelha, representam o marcador molecular (Size Standard 80).

Através desta sequenciação, pela técnica SBE, foi possível genotipar todos os 66 isolados introduzidos no estudo. Em cada isolado submetido à técnica SBE, cinco SNPs foram genotipados. Para os 66 isolados de *P. jirovecii*, um total de pelo menos 330 SNPs foram identificados, analisados e caracterizados.

Com os resultados da genotipagem *multilocus*, apresentados no **Quadro XIV.A**, foi possível obter as frequências alélicas de cada um dos cinco SNPs (**Quadro XIV.B**) e determinar, teoricamente, os MLG presentes nos isolados analisados (**Quadro XV**).

**Quadro XIV.** Resultados da genotipagem *multilocus* dos cinco SNPs considerados relevantes para o estudo (**A**) e respectivas frequências (**B**), após sequenciação por SBE.

<b>A</b>	SNP	Identidade Nucleotídica	N (%) dos isolados	<b>B</b> Frequência dos SNPs	
				SNP	N (%)
<i>mt85</i>		C	20 (30)	<i>mt85C</i>	28 (34)
		A	17 (26)		
		T	12 (18)		
		C/A*	6 (9)		
		C/T*	2 (3)		
		A/T*	9 (14)		
<i>SOD110</i>		C	22 (33)	<i>SOD110C</i>	29 (40)
		T	37 (56)	<i>SOD110T</i>	44 (60)
		C/T*	7 (11)		
<i>SOD215</i>		T	16 (24)	<i>SOD215T</i>	29 (37)
		C	37 (56)	<i>SOD215C</i>	50 (63)
		T/C*	13 (20)		
<i>DHPS165</i>		A	59 (89)	<i>DHPS165A</i>	61 (90)
		G	5 (8)	<i>DHPS165G</i>	7 (10)
		A/G*	2 (3)		
<i>DHPS171</i>		C	59 (89)	<i>DHPS171C</i>	62 (90)
		T	4 (6)	<i>DHPS171T</i>	7 (10)
		C/T*	3 (5)		

\*Polimorfismos contabilizados duas vezes, para o cálculo da frequência, por pertencerem a isolados que contêm mais do que uma base para a mesma posição nucleotídica. Isolados com mais do que um genótipo.

“/” indica a existência de duas entidades nucleotídicas na mesma posição; N: número de indivíduos.

Pela observação dos resultados de genotipagem (**Quadro XIV.A**) constatou-se que, na população dos isolados em estudo, todas as formas alélicas caracterizadas para

os cinco SNPs, encontravam-se presentes. Também foi possível constatar que muitos dos isolados analisados apresentavam, em determinados SNPs, mais do que um nucleótido, evidenciando a existência de infecções mistas, com a presença de mais do que um genótipo do microrganismo.

Em termos de frequência, e considerando o SNP *mt85*, verificou-se que *mt85A* e *mt85C* são os alelos mais frequentes, com distribuições de 38% e de 34% respectivamente, seguido pelo *mt85T* com uma frequência de 28% (**Quadro XIV.B**). Em relação aos SNPs do gene SOD, verificou-se que o SNP *SOD110* possuía uma frequência de distribuição de 60% para *SOD110T* e de 40% para *SOD110C*; e que o SNP *SOD215* possuía uma frequência de distribuição de 63% para *SOD215C* e de 37% para *SOD215T* (**Quadro XIV.B**). Por último, os SNPs presentes no *locus* DHPS, *DHPS165* e *DHPS171*, representam frequência alélicas de 90% para *DHPS165A* e *DHPS171C* e de 10% para *DHPS165G* e *DHPS171T* (**Quadro XIV.B**).

Também foi tida em conta a análise dos possíveis MLGs presentes na população de isolados de *P. jirovecii* deste estudo. Vinte e nove MLGs foram facilmente determinados (**Quadro XV**). Cerca de 56% (37/66) dos isolados caracterizados continham apenas um tipo de MLG, o que pode evidenciar a presença de um único subtipo de *P. jirovecii*. Treze dos 29 MLGs determinados (MLG3, MLG5, MLG6, MLG7, MLG10, MLG11, MLG12, MLG13, MLG14, MLG17, MLG18, MLG22 e MLG29) foram identificados neste tipo de isolados. Em contrapartida, os restantes 44% (29/66) dos isolados, podem apresentar mais do que um genótipo de *P. jirovecii*, uma vez que, pela análise dos resultados da genotipagem, constatou-se a presença de sequências complexas caracterizadas pela existência de mais do que um alelo num mesmo SNP. A maioria (19/29; 66%) destes isolados, apresentavam sequências complexas que determinam a presença de pelo menos dois genótipos distintos, sendo que, em alguns isolados, devido à complexidade verificada, foi possível determinar a presença de mais do que cinco MLGs putativos.

Como é possível verificar no quadro seguinte (**Quadro XV**), a frequência de cada MLG variou entre 1 a 14%, sendo os MLG5, MLG7, MLG10 e MLG13, aqueles que apresentam frequências superiores a 10%.

**Quadro XV.** MLGs putativos identificados nos 66 isolados de *P. jirovecii*, e as suas respectivas frequências.

MLG	<i>mt85</i>	<i>DHPS165</i>	<i>SOD215</i>	<i>SOD110</i>	<i>DHPS171</i>	Frequência de cada MLG
1	A	A	T	T	T	1%
2	A	A	C	C	T	1%
3	A	A	T	C	T	1%
4	A	A	C	T	T	1%
5	C	A	C	T	C	14%
6	C	A	T	C	C	7%
7	A	A	T	C	C	12%
8	A	A	C	C	C	6%
9	A	A	T	T	C	4%
10	A	A	C	T	C	14%
11	T	A	C	C	C	3%
12	T	A	T	T	C	2%
13	T	A	C	T	C	11%
14	T	A	T	C	C	5%
15	C	A	C	C	C	4%
16	C	A	T	T	C	1%
17	C	G	C	T	T	1%
18	T	G	C	T	T	1%
19	T	G	T	T	T	1%
20	T	G	T	T	C	1%
21	A	G	C	C	C	1%
22	A	G	T	C	C	1%
23	T	G	C	C	C	1%
24	T	G	T	C	C	1%
25	T	A	C	T	T	1%
26	T	G	C	T	C	1%
27	C	A	C	C	T	1%
28	C	A	T	C	T	1%
29	C	G	C	C	T	1%

Os MLGs foram determinados tendo em consideração os resultados da genotipagem referente aos cinco SNPs (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*) seleccionados para o estudo *multilocus*.

### 3.6. Análise estatística

A variabilidade genética de *P. jirovecii* foi estudada através de uma abordagem estatística para verificar a possível existência de associações entre os SNPs/MLGs e parâmetros demográficos e clínicos da PPc, bem como entre os SNPs identificados. Toda esta análise foi efectuada a partir de variáveis qualitativas pelo programa SPSS, através do teste  $\chi^2$  ou o teste exacto de Fisher.

Os isolados caracterizados contendo uma mistura de genótipos, ou seja, com mais do que uma forma alélica em determinado SNP, foram contabilizados pelo número de genótipos que apresentavam, contribuindo mais do que uma vez para a análise estatística.

#### 3.6.1. Análise estatística descritiva entre os SNPs e dados demográficos e clínicos

Os **Quadros XVI, XVII, XVIII e XIX** sumarizam os resultados obtidos entre a distribuição das frequências dos SNPs, em relação aos dados demográficos e clínicos dos doentes. Estes resultados foram analisados com o intuito de verificar prováveis associações estatísticas entre os SNPs e os parâmetros mais importantes da infecção por *P. jirovecii*. As informações mais relevantes, obtidas após a análise estatística, serão referidas ao longo desta secção.

Primeiramente, nenhuma associação estatística entre as distribuições dos SNPs em relação ao grupo etário, dos doentes incluídos neste estudo, foi verificada (**Quadro XVI**). Em relação ao género, uma variação na distribuição alélica do SNP *mt85*, aparentemente relevante, foi constatada. A frequência de *mt85T* em isolados de doentes do sexo feminino é relativamente superior (10 isolados; 43%;  $P=0,05$ ) quando comparada com as frequências encontradas para *mt85C* (8 isolados; 30%) e *mt85A* (6 isolados; 19%) (**Quadro XVI**). Variações semelhantes também foram verificadas nos restantes SNPs, em que *SOD110T* e *SOD215C*, *DHPS165G* e *DHPS171T* são menos frequentes em isolados de doentes do sexo masculino, em relação a *SOD110C* e *SOD215T*, *DHPS165A* e *DHPS171C* que são os mais frequentes (**Quadro XVI**).

Alguns dos resultados também sugerem uma importância ao nível da distribuição alélica do SNP *mt85* do gene mtLSU rRNA, relacionada com determinadas

épocas do ano. Uma associação estatisticamente significativa entre *mt85C* e isolados provenientes de amostras recolhidas entre os meses de Março a Junho (11 isolados; 39%;  $P=0,006$ ) foi verificada, enquanto *mt85A* (4 isolados; 13%;  $P=0,05$ ) e *mt85T* (3 isolados; 13%) são menos frequentes em isolados recolhidos na mesma altura do ano (Primavera), sendo mais comuns em isolados recolhidos em outras estações do ano (**Quadro XVI**).

Do ponto de vista clínico, e considerando a informação referente ao diagnóstico clínico (Sugestivo/Não sugestivo para a PPc), verificou-se que os SNPs *DHPS165G* (7 isolados; 100%) e *mt85T* (22 isolados; 96%) são os que apresentam uma frequência mais elevada entre isolados de doentes com diagnóstico clínico sugestivo para PPc (**Quadro XVII**). Em relação ao parâmetro laboratorial contagem de células TCD4<sup>+</sup>, *DHPS171T* (5 isolados; 100%), *SOD215T* (16 isolados; 67%) e *mt85T* (11 isolados; 65%) são os três SNPs que possuem frequências alélicas mais elevada entre os isolados de doentes que possuem contagens celulares TCD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup> (**Quadro XVII**). No entanto, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi verificada entre os SNPs referidos, ou entre os restantes SNPs, com os parâmetros clínicos mencionados anteriormente.

SNPs

Características

Características Clínicas	SNPs										
	<i>mt85C</i>	<i>mt85A</i>	<i>mt85T</i>	<i>SOD110C</i>	<i>SOD110T</i>	<i>SOD215T</i>	<i>SOD215C</i>	<i>DHPS165A</i>	<i>DHPS165G</i>	<i>DHPS171C</i>	<i>DHPS171T</i>
Sugestivo para a PPc	24 (86)	26 (81)	22 (96)	26 (90)	40 (91)	26 (90)	45 (90)	54 (89)	7 (100)	55 (89)	6 (86)
Não sugestivo para a PPc	4 (14)	6 (19)	1 (4)	3 (10)	4 (9)	3 (10)	5 (10)	7 (11)	0	7 (11)	1 (14)
<b>Diagnóstico Clínico</b>											
$> 200$ cel/mm <sup>3</sup>	1 (4)	2 (7)	1 (6)	0	2 (5)	0	2 (5)	2 (4)	0	2 (4)	0
$200 \leq X <$ $50$ cel/mm <sup>3</sup>	9 (39)	10 (37)	5 (29)	9 (38)	12 (32)	8 (33)	15 (36)	19 (37)	2 (40)	20 (39)	0
$< 50$ cel/mm <sup>3</sup>	13 (57)	15 (56)	11 (65)	15 (62)	23 (62)	16 (67)	25 (59)	30 (59)	3 (60)	29 (57)	5 (100)
<b>Es</b>											
Inverno	4 (15)	11 (34)	8 (35)	8 (28)	10 (23)	9 (31)	12 (24)	17 (28)	2 (28)	16 (26)	2 (29)

\* Associações estatísticas  
Regressão  
Os grupos são  
anos; Grupo IV, indivíduos  
dados

Considerando a distribuição alélica dos SNPs com as informações disponibilizadas dos doentes em relação aos regimes profilático e terapêutico aplicados, bem como em relação à evolução clínica, não se verificaram associações estatísticas significativas. Entretanto, *DHPS165G* e *DHPS171T* parecem ser mais frequentes em isolados de doentes com terapia anti-PPc instituída (ambos em 6 isolados; 86%). *DHPS171T* também parece estar relacionado com uma evolução clínica negativa, apresentando a frequência mais elevada, em termos de distribuição alélica (2 isolados; 40%) em comparação com os restantes SNPs, enquanto que *mt85C* parece ser o SNP menos associado com uma evolução clínica negativa (2 isolados; 11%) estando mais frequentemente relacionado com isolados de doentes com uma evolução clínica positiva (17 isolados; 89%) (**Quadro XVIII**).

Continuando a análise através do **Quadro XIX**, e tendo em conta a informação para cada um dos *locus* em estudo (*mtLSU rRNA*, *SOD* e *DHPS*), em relação à carga parasitária, verifica-se, que os SNPs *mt85C*, *SOD110T* e *SOD215C* são mais comuns em isolados com carga parasitária baixa (*mt85C* – 6 isolados; 21%, *SOD110T* – 7 isolados; 16%, e *SOD215C* – 7 isolados; 14%). Ainda, verificou-se que *mt85C* é significativamente mais frequente em isolados com carga parasitária baixa a moderada (22 isolados; 79%;  $P=0,006$ ) do que em isolados com carga parasitária alta (6 isolados; 21%;  $P=0,006$ ). Em relação aos outros alelos, *mt85A* e *mt85T*, *SOD110C* e *SOD215T*, provavelmente estarão relacionados com cargas parasitárias altas (*mt85A* – 13 isolados; 41% / *mt85T* – 16 isolados; 70%;  $P=0,001$  / *SOD110C* – 12 isolados; 14% / *SOD215T* – 12 isolados; 14%). Também os SNPs *DHPS165A* e *DHPS171C* são detectados com maior frequência em isolados com cargas parasitárias altas (ambos com 26 isolados; 43% e 42% respectivamente). *mt85T* foi estatisticamente associado com isolados de doentes que não possuem carga parasitária baixa a moderada (16 isolados; 70%;  $P=0,001$ ), o que comprova o que já foi referido, que este SNP está associado com carga parasitárias altas. Por fim, nenhuma associação relevante foi verificada entre os grupos clínicos e SNPs específicos. As constatações a serem mencionadas prendem-se com o facto de que todos os isolados com o SNP *DHPS165G* foram classificados no grupo de doentes com caso de PPc confirmada (grupo A), e que todos os doentes classificados no grupo C (doentes colonizados por *P. jirovecii*) possuíam isolados com o SNP *mt85C* (**Quadro XIX**).

Características Clínicas	SNPs										
	mt85C	mt85A	mt85T	SOD110C	SOD110T	SOD215T	SOD215C	DHPS165A	DHPS165G	DHPS171C	DHPS171T
Baixa	6 (21)	4 (12)	2 (8)	2 (7)	7 (16)	3 (10)	7 (14)	8 (13)	1 (14)	9 (15)	1 (14)
Moderada	16 (58)	15 (47)	5 (22)	15 (52)	20 (45)	14 (48)	25 (50)	27 (44)	4 (57)	27 (43)	4 (57)
Elevada	6 (21)*	13 (41)	16 (70)*	12 (41)	17 (39)	12 (42)	18 (36)	26 (43)	2 (29)	26 (42)	2 Alta
A	24 (86)	28 (88)	22 (96)	26 (90)	40 (92)	26 (90)	45 (90)	54 (88)	7 (100)	55 (89)	6 (86)
B	1 (3)	3 (9)	1 (4)	2 (7)	2 (4)	2 (7)	3 (6)	4 (7)	0	4 (6)	1 (14)
C	3 (11)	1 (3)	0	1 (3)	2 (4)	1 (3)	2 (4)	3 (5)	0	3 (5)	0
Positiva	17 (89)	15 (88)	12 (75)	17 (71)	22 (76)	17 (71)	20 (76)	52 (75)	4 (80)	55 (77)	5 (100)
Negativa	2 (11)	7 (32)	4 (25)	7 (29)	7 (24)	7 (29)	8 (24)	12 (27)	1 (20)	10 (23)	2 (40)
Evlução Clíni N (%)	* Associações estatisticamente signifi cantes Os grupos clínicos foram definidos subclínica (indivíduos colonizados p										

Resultados

os resultados mais relevantes da distribuição dos MLGs mais frequentes, pelos dados demográficos e clínicos tendo-se verificado associações estatisticamente significativas.

O parâmetro demográfico relacionado com o período de colheita da amostra demonstrou ser estatisticamente importante entre alguns MLGs (**Quadro XX**). Isolados caracterizados com o MLG5 estão significativamente mais associados com períodos de colheita das amostras entre os meses correspondentes as estações do ano Primavera, Verão e Outono do que nos meses de Inverno (1 isolado; 6%;  $P=0,027$ ). O mesmo acontece com isolados identificados com o MLG13, os quais foram detectados entre o período compreendido pelos meses de Verão a Inverno, não sendo detectado em nenhum isolado pertencente a amostras colhidas na Primavera (0 isolados; 0%;  $P=0,028$ ). Já o MLG12 encontra-se estatisticamente associado com os meses de Setembro a Dezembro (Outono), uma vez que todos os isolados com este MLG foram colhidos neste período do ano (3 isolados; 100%;  $P=0,015$ ) (**Quadro XX**).

O MLG5 também foi significativamente associado com o diagnóstico clínico de PPc. Diagnóstico clínico sugestivo foi menos comum em doentes que apresentavam uma infecção por *P. jirovecii* com o MLG5 (13 isolados, 72%,  $P=0,030$ ), quando comparado com o grupo das restantes combinações *multilocus* identificadas em outros isolados (**Quadro XX**).

Por último, associações entre MLGs e a carga parasitária também foram observadas. A frequência de MLG5 foi significativa entre isolados com carga parasitária baixa (5 isolados; 28%;  $P=0,05$ ). MLG9 foi mais comum em isolados com carga parasitária moderada (5 isolados; 100%;  $P=0,017$ ). MLG13 foi mais frequente em isolados com carga parasitária alta (10 isolados; 72%;  $P=0,009$ ).

Características Demográficas e Clínicas		MLGs												
		MLG5	MLG6	MLG7	MLG8	MLG9	MLG10	MLG11	MLG12	MLG13	MLG14	MLG15		
Estação do Ano N (%)	Primavera	7 (38)	3 (33)	1 (7)	2 (25)	1 (20)	4 (22)	0	0	0*	1 (14)	1 (20)		
	Verão	5 (28)	2 (23)	4 (27)	2 (25)	1 (20)	6 (34)	1 (25)	0	4 (28)	0	2 (40)		
	Outono	5 (28)	1 (11)	5 (33)	3 (38)	2 (40)	4 (22)	2 (50)	3 (100)*	4 (28)	4 (58)	1 (20)		
	Inverno	1 (6)*	3 (33)	5 (33)	1 (12)	1 (20)	4 (22)	1 (25)	0	6 (44)	2 (28)	1 (20)		
Diagnóstico Clínico N (%)	Sugestivo para a PPc	13 (72)*	7 (78)	14 (93)	8 (100)	5 (100)	16 (89)	4 (100)	3 (100)	13 (93)	7 (100)	4 (80)		
	Não sugestivo para a PPc	5 (28)	2 (22)	1 (7)	0	0	2 (11)	0	0	1 (7)	0	1 (20)		
Carga Parasitária N (%)	Baixa	5 (28)*	1 (11)	1 (7)	1 (12)	0	3 (17)	0	0	1 (7)	0	0		
	Moderada	9 (50)	5 (56)	9 (60)	6 (76)	5 (100)*	9 (50)	3 (75)	2 (67)	3 (21)	3 (43)	4 (80)		
	Elevada	4 (22)	3 (33)	5 (33)	1 (12)	0	6 (33)	1 (25)	1 (33)	10 (72)*	4 (57)	1 (20)		

\* Associações estatisticamente

Resultados

### 3.6.3. Análise estatística descritiva entre os SNPs

Uma das abordagens efectuadas neste estudo foi a análise de correlação estatística entre os SNPs. Através desta análise foi possível verificar algumas associações estatisticamente significativas, nomeadamente entre os SNPs *SOD110T* e *SOD215C*, *SOD110C* e *SOD215T*, *DHPS165A* e *DHPS171C*, e entre *DHPS165G* e *DHPS171T*.

*SOD110T* foi mais frequente entre isolados com *SOD215C*. De facto, 42 dos 50 isolados que apresentavam *SOD110T* também continham o SNP *SOD215C* (96%;  $P < 0,001$ ). Do mesmo modo, 26 dos 29 isolados que apresentavam o SNP *SOD110C* também apresentavam o SNP *SOD215T* (90%;  $P < 0,001$ ), sendo que *SOD110C* foi mais frequente entre isolados com *SOD215T*.

A associação encontrada entre *DHPS165A* e *DHPS171C* também indica que esta combinação é frequente entre os isolados. Sessenta dos 61 isolados caracterizados com o SNP *DHPS165A* também apresentavam o SNP *DHPS171C* (98%;  $P = 0,001$ ), da mesma forma que o SNP *DHPS165G* foi mais comum entre isolados com *DHPS171T* (em 5 dos 7 isolados; 71%;  $P < 0,001$ ).

A análise efectuada através do programa SNPStats permitiu demonstrar significativamente ( $P < 0,001$ ) que os SNPs nas bases 110 e 215 do gene SOD, assim como os SNPs nas bases 165 e 171 do gene DHPS encontram-se em desequilíbrio de ligação.

### 3.7. Análise genética

A estrutura da população dos isolados de *P. jirovecii* deste estudo foi analisada a partir de um teste estatístico combinatório proposto por Tibayrenc *et al.* 1990, correntemente denominado por d1. Este teste é normalmente implementado para verificar a existência de associações não aleatórias entre diferentes marcadores genéticos. Neste caso, foi calculado para verificar a probabilidade de ocorrência de associações entre os *loci* polimórficos mtLSU rRNA, SOD e DHPS, de *P. jirovecii*, através dos resultados obtidos dos MLGs putativos identificados a partir dos três *loci* referidos.

A aplicação do teste foi efectuada em 10 MLGs (MLG5, MLG6, MLG7, MLG8, MLG9, MLG10, MLG11, MLG13, MLG14, MLG15) escolhidos por serem os mais representativos, com frequências de distribuição superiores a 2% (ver **Quadro XV**, secção “3.5. Genotipagem pela técnica SBE”).

Para o teste foi necessário calcular as frequências esperadas e observadas de distribuição de cada MLG, assumindo, à partida, associações aleatórias entre os *loci*. Os resultados das frequências, bem como o valor de *P*, definido pelo teste d1, através da aplicação da fórmula referida na secção “2.6. Interpretação dos resultados”, do capítulo “2. Material e métodos”, encontram-se descritos no **Quadro XXI**.

Pela análise dos resultados obtidos, pelo cálculo das frequências em cada MLG, verifica-se que, em alguns casos, as frequências observadas são elevadas em comparação com a frequência esperada. Ainda, pela análise dos valores de *P* obtidos através do teste d1 foi possível verificar que dois destes MLGs, MLG7 ( $P=0,0006$ ) e MLG9 ( $P=0,0249$ ), são mais predominantes do que o esperado, sendo fortemente representativos, sugerindo um significativo desvio a recombinação genética aleatória.

**Quadro XXI.** Frequências esperadas e observadas dos MLGs escolhidos para o cálculo do teste estatístico combinatório, bem como os respectivos valores de  $P$  obtidos após aplicação do teste d1.

MLGs	Frequência esperada	Frequência observada	Teste d1
5	0,1021	0,1417	0,096
6	0,0390	0,0708	0,062
7	0,0446	0,1181	0,0006*
8	0,0769	0,0630	NA
9	0,0676	0,1181	0,0249*
10	0,1166	0,1417	0,2236
11	0,0554	0,0315	NA
13	0,0839	0,1102	0,1787
14	0,0321	0,0551	0,1154
15	0,0674	0,0394	NA

\*Resultados de  $P$  significativos ( $P \leq 0,05$ ), que rejeitam a hipótese nula.

NA: Teste não aplicado porque a frequência de distribuição esperada foi superior à observada.

As características genéticas de cada MLG encontram-se descritas no **Quadro XV**.

---

## ***DISCUSSÃO E CONCLUSÕES***

#### 4.1. Análise dos resultados da caracterização genética de isolados nos *loci* CYB e DHPS (Estudo prévio)

Através dos resultados do estudo prévio foi possível verificar que, em termos metodológicos, a reacção de PCR não foi eficiente para a amplificação dos fragmentos pretendidos, para ambos os genes, em alguns dos isolados seleccionados. Esta falta de eficácia de amplificação, poderá dever-se à pouca quantidade de DNA presente em amostras pertencentes a isolados de *P. jirovecii*, as quais possuem baixa carga parasitária. Foi também possível verificar que a eficiência de amplificação para o gene DHPS (84%) foi superior à eficiência de amplificação para o gene CYB (71%). Tendo em conta que as condições térmicas de amplificação foram idênticas, a diferença encontrada poderá ser explicada pelo facto da reacção de PCR estar melhor optimizada para a amplificação do fragmento pretendido em DHPS.

Em termos de variabilidade, foi ainda possível verificar que, como era de esperar, a maioria dos isolados seleccionados apresentavam sequências idênticas às sequências definidas como *wild-type*, descritas por Walker *et al.* (1998) e por Lane *et al.* (1997) para os genes CYB e DHPS, respectivamente. A presença de sequências variantes foi constatada principalmente em CYB, que demonstrou possuir maior diversidade em comparação com o gene DHPS. As diferenças, em relação à quantidade de variações nucleotídicas encontradas dever-se-á, muito provavelmente, ao facto de a taxa polimórfica detectada no DNA mitocondrial ser substancialmente superior à taxa normalmente detectada no DNA nuclear (Kazanjian *et al.* 2001). Também, a identificação de sequências nunca antes descritas para o *locus* CYB neste estudo, constitui forte indicação de grande variabilidade deste gene nos isolados de *P. jirovecii* em Portugal. Por outro lado, a identificação de polimorfismos em apenas duas posições nucleotídicas em sequências do gene DHPS poderá ser uma forte indicação para uma provável selecção genética favorável, devido ao uso corrente de fármacos da família das sulfas, para prevenção e controlo da PPc, em Portugal (Kazanjian *et al.* 2000; Valerio *et al.* 2007).

Outras considerações sobre os resultados obtidos no estudo prévio serão discutidas na próxima secção deste capítulo.

## 4.2. Selecção dos marcadores genéticos mais informativos

De entre os genes mtLSU rRNA, SOD, CYB, DHPS e DHFR, escolhidos *a priori*, após uma extensa investigação bibliográfica, foi necessário restringir e seleccionar os marcadores que possuíam carácter mais informativo para o estudo genético *multilocus* pretendido com este trabalho. A escolha foi baseada na identificação das variações polimórficas mais prevalentes, encontradas em isolados de *P. jirovecii* em Portugal, completada com uma análise de caracterização genética prévia, realizada no decorrer do presente estudo, aos genes CYB e DHPS; e na constatação da actual importância epidemiológica das variações identificadas, suportada pela informação prévia disponível, para as cinco regiões genómicas de interesse, em estudos epidemiológicos realizados por diversos grupos de investigação em todo o mundo.

- **Locus mtLSU rRNA.** Em *P. jirovecii*, estudos sobre a variação de sequências do gene mtLSU rRNA, em Portugal, têm identificado, com grande frequência, variações polimórficas sinónimas na posição nucleotídica 85 (*mt85*). *mt85C*, *mt85A* e *mt85T* são os SNPs identificados para esta posição nucleotídica cujas frequências de distribuição alélica compreendem um intervalo entre 12-55%, 22-45% e 15-43%, respectivamente (Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b, 2011, 2012).

Em termos epidemiológicos, estudos sugerem uma potencial associação entre *mt85C* e cargas parasitárias baixas, assim como entre os SNPs *mt85A* e *mt85T* e cargas parasitárias altas. O significado estatístico dessas associações foi já observado entre *mt85C* e carga parasitária baixa a moderada, e entre *mt85T* e carga parasitária alta, o que incentiva ao estudo destas variações, principalmente para identificação de perfis epidemiológicos e clínicos na infecção por *P. jirovecii* (Esteves *et al.* 2010a, 2011, 2012).

- **Locus SOD.** A diversidade genética encontrada no gene SOD de *P. jirovecii*, em isolados de Portugal, está maioritariamente relacionada com variações sinónimas identificadas nas posições nucleotídicas 110 (*SOD110*) e 215 (*SOD215*), caracterizadas pelos SNPs *SOD110C* ou *SOD110T* e *SOD215T* ou *SOD215C*. Em termos de

distribuição de frequência, verifica-se que *SOD110C* apresenta uma frequência de 18-60% e *SOD215T* apresenta uma frequência de 29-62%, seguindo-se pelas suas variações que apresentam frequências entre 40-82% para o *SOD110T* e 38-74% para o *SOD215C* (Esteves *et al.* 2010a, 2010b, 2011, 2012).

Estudos recentes sugerem que tais SNPs poderão ser importantes ao nível da infecção por *P. jirovecii* apresentando-se como variações polimórficas interessantes em termos epidemiológicos e mesmo do ponto de vista clínico. Especificamente, alguns estudos indicam que os SNPs *SOD110T* e *SOD215C* estão relacionados com episódios de PPc com cargas parasitárias baixas a moderadas, e, por sua vez, os SNPs *SOD110C* e *SOD215T* são mais frequentes em casos de PPc com cargas parasitárias altas. Estes SNPs também parecem ter alguma importância a nível da evolução clínica dos doentes com PPc (Miller *et al.* 2005a; Esteves *et al.* 2010a, 2010b, 2011, 2012). Num estudo semelhante de 2010 (Esteves *et al.* 2010a), constatou-se que o SNP *SOD215C* foi significativamente mais frequente em casos de PPc com uma evolução clínica positiva.

- **Locus DHFR.** Em Portugal, a alteração identificada de forma mais frequente no gene DHFR de *P. jirovecii*, está presente na posição polimórfica 312 (*DHFR312*) da sua sequência nucleotídica. No que diz respeito à sua distribuição, verifica-se que o SNP *DHFR312T* apresenta uma frequência entre 73-92% e a sua variação, *DHFR312C*, apresenta uma frequência de 8-24% (Costa *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2010a, 2010b, 2011, 2012).

A importância epidemiológica deste polimorfismo sinónimo foi já relacionada com a quantificação da carga parasitária. De facto, Esteves *et al.* (2010a, 2011) verificaram que o SNP *DHFR312T* foi relativamente mais frequente em isolados de doentes com cargas parasitárias moderadas a altas, e o SNP *DHFR312C* com cargas parasitárias baixas. No entanto, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada até à data (Costa *et al.* 2006; Esteves *et al.* 2010a, 2011 e 2012; Nahimana *et al.* 2004), tornando este SNP pouco atractivo para a investigação epidemiológica.

- **Locus CYB.** O gene CYB é um *locus* muito polimórfico, tendo sido já caracterizadas inúmeras variações em diferentes posições nucleotídicas (Walker *et al.*

1998; Kazanjian *et al.* 2001; Takahashi *et al.* 2002b). No estudo preliminar efectuado, no decorrer do presente trabalho, para a caracterização deste gene em isolados de *P. jirovecii* em Portugal, verificou-se a presença de variações em cinco posições polimórficas já identificadas num estudo anterior (Esteves *et al.* 2010b), nomeadamente nas posições 279, 516, 547, 566 e 838 do gene CYB, sendo as variações nas posições 279, 516 e 547 as mais frequentes. Na posição 516 foram caracterizados o SNP *CYB516C* e a sua variação *CYB516T* com uma frequência de distribuição de 77% e 23%, respectivamente. Já os SNPs identificados nas posições 279 e 547 apresentam uma frequência de distribuição de 88% para os SNPs *CYB279C* e *CYB547C* e de 12% para as variações *CYB279T* e *CYB547T*.

Sabe-se que mutações encontradas neste gene podem estar associadas com a exposição prévia ao fármaco atovaquona, nomeadamente polimorfismos pontuais não sinónimos, situados próximos e na região do domínio Q<sub>0</sub> (Walker *et al.* 1998; Kazanjian *et al.* 2001). Contudo, os polimorfismos aqui caracterizados, com maior frequência, durante o estudo prévio, são sinónimos, e nenhuma implicação relacionada com fenómenos de resistência a fármacos, ou outros parâmetros da infecção por *P. jirovecii*, foi verificada até ao momento (Esteves *et al.* 2010a, 2010b). Também as mutações detectadas nos aminoácidos 189 e 280 (caracterizadas no estudo prévio, com frequências inferiores, 4% e 8% respectivamente), não se encontram relacionadas com o domínio proteico de ligação à ubiquinona (região Q<sub>0</sub>).

A escassa relevância epidemiológica do conjunto de SNPs caracterizados, e também o facto do fármaco, possivelmente implicado com fenómenos de resistência no gene CYB, a atovaquona, ser raramente utilizado, impediu a introdução do marcador genético CYB no estudo *multilocus*.

- **Locus DHPS.** A caracterização genética do gene DHPS realizada em isolados de *P. jirovecii*, neste estudo, identificou a presença de variações nucleotídicas em apenas duas localizações polimórficas, na posição 165 e 171, também detectadas em estudos portugueses anteriores (Costa *et al.* 2003, 2005; Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b). As variações não sinónimas encontradas nestas posições, os SNPs *DHPS165G* e *DHPS171T*, apresentaram uma distribuição de frequência de 13%. Os SNPs

característicos das sequências *wild-type* do gene DHPS, *DHPS165A* e *DHPS171C*, apresentaram uma frequência de 87%.

As mutações caracterizadas nas posições nucleotídicas referidas possuem uma relevância considerável ao nível da implicação clínica, sobretudo na possível implicação em fenómenos de resistência a fármacos (Costa *et al.* 2006). Inúmeros estudos já demonstraram uma correlação estatisticamente significativa entre os SNPs presentes neste gene, nas posições 165 e 171, com a frequente utilização de TMP-SMZ (e outras sulfas) como medida profiláctica contra a PPc (Kazanjian *et al.* 1998, 2000; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Ma *et al.* 1999, 2002; Huang *et al.* 2000; Visconti *et al.* 2001; Miller *et al.* 2003; Nahimana *et al.* 2003; Hauser *et al.* 2010; Matos & Esteves 2010a).

- **Seleção.** Em termos de distribuição, a maioria dos SNPs referidos possuem frequências consideráveis, sendo representativos da população de isolados caracterizada ao longo dos últimos anos em Portugal. Deste modo, para a selecção, foi preferencialmente considerada a importância epidemiológica dos SNPs em cada um dos cinco marcadores genéticos.

Os SNPs considerados como os mais relevantes, para o estudo *multilocus*, foram os identificados nos genes mtLSU rRNA (SNP: *mt85*), SOD (SNPs: *SOD110* e *SOD215*) e DHPS (SNPs: *DHPS165* e *DHPS171T*). A constatação de associações estatisticamente significativas, com um nível de significância  $P \leq 0,05$ , entre os SNPs referidos e parâmetros específicos da infecção por *P. jirovecii* (como a carga parasitária, a evolução clínica, ou a resistência a fármacos) permitiu seleccioná-los como os mais promissores (Kazanjian *et al.* 1998, 2000; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Ma *et al.* 1999, 2002; Huang *et al.* 2000; Visconti *et al.* 2001; Miller *et al.* 2003; Nahimana *et al.* 2003; Hauser *et al.* 2010; Esteves *et al.* 2010a; 2011).

Com o estudo *multilocus* pretendeu-se analisar com maior pormenor a importância clínica e epidemiológica dos SNPs seleccionados, através da aquisição de mais informação e esclarecimento acerca das potenciais associações entre estas variações genéticas e os parâmetros clínicos da doença.

### 4.3. Padrões de distribuição dos SNPs em estudo, caracterizados pela metodologia MPCR/SBE

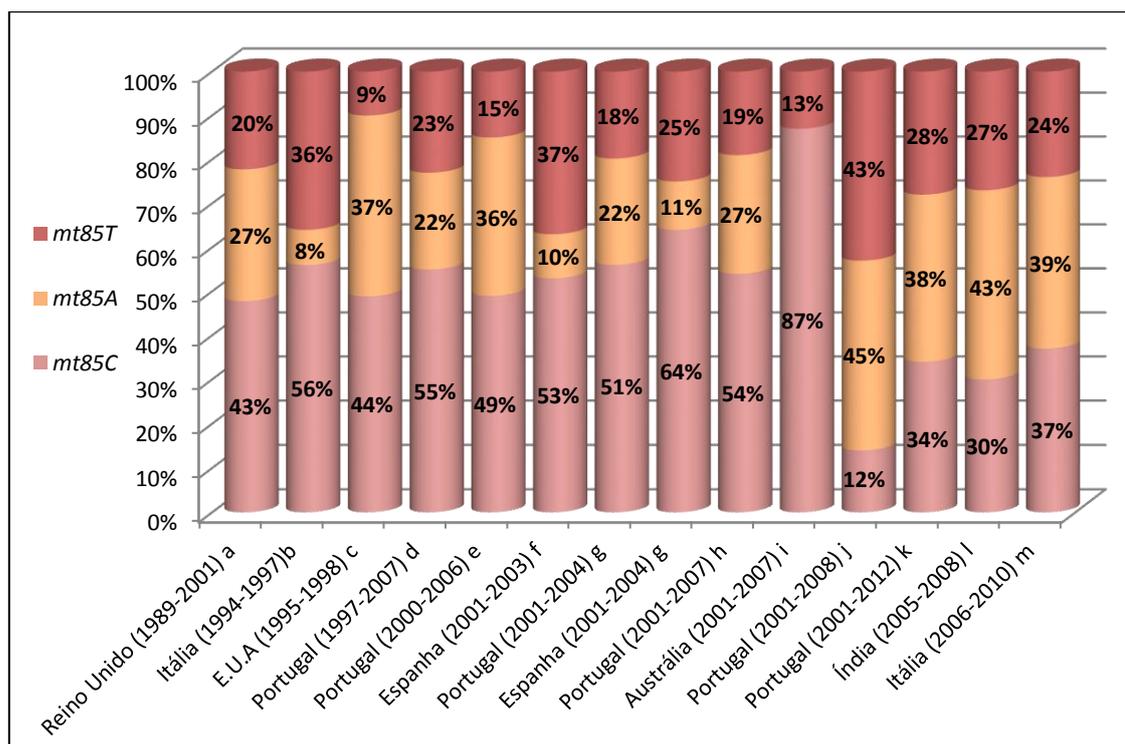
#### 4.3.1. Distribuição da frequência do SNP *mt85*

A distribuição de frequências das formas alélicas do SNP *mt85*, situado na posição nucleotídica 85 do gene *mtLSU rRNA*, encontrada no presente estudo, em isolados de *P. jirovecii* obtidos entre 2001 e 2012 em Lisboa, Portugal, indicou que, *mt85A* foi o SNP mais frequente (38%), seguido pelo *mt85C* (34%), e pela variação *mt85T* (28%). Este padrão de distribuição foi já observado em dois estudos publicados recentemente (Gupta *et al.* 2011; Dimonte *et al.* 2012). Dimonte *et al.* (2012), numa população de isolados de *P. jirovecii* obtida entre 2006 e 2010, a partir de doentes hospitalizados em Roma, Itália, também constataram uma maior frequência entre genótipos com *mt85A*, verificando que *mt85A* foi o SNP mais prevalente, com uma frequência de 39%, seguido por *mt85C* (37%) e *mt85T* (24%). Gupta *et al.* (2011), no subcontinente Indiano, numa população de isolados de *P. jirovecii* obtida entre 2005 e 2008, verificaram que *mt85A* para além de ter sido o genótipo mais prevalente identificado, foi o SNP que possuía uma maior frequência (43%) perante as frequências de *mt85C* (30%) e de *mt85T* (27%). Outro estudo de 2012, realizado em populações de isolados de *P. jirovecii* obtidos entre 2001 e 2008 em Portugal, verificaram uma maior prevalência dos SNPs *mt85A* e *mt85T* em relação ao SNP *mt85C*, com frequências de 45% para *mt85A*, de 43% para *mt85T* e de 12% para *mt85C* (Esteves *et al.* 2012).

Contrariamente a estes dados, outros estudos europeus, verificaram uma maior frequência de *mt85C* em relação às outras duas variações alélicas (Vopel *et al.* 2001; Montes-Cano *et al.* 2004; Miller *et al.* 2005b; Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b, 2011). Com frequências de 49% (2000-2006), 51% (2001-2004), 54% (2001-2007) e 55% (1997-2007) em Portugal (Esteves *et al.* 2011; Esteves *et al.* 2008; Esteves *et al.* 2010b; Esteves *et al.* 2010a, respectivamente); 53% (2001-2003) e 64% (2001-2004) em Espanha (Montes-Cano *et al.* 2004; Esteves *et al.* 2008, respectivamente); de 43% (1989-2001) no Reino Unido (Miller *et al.* 2005b); e de 56% (1994-1997) em Itália. Igualmente, em estudos realizados nos Estados Unidos da América (E.U.A.) e na Austrália, verificou-se uma frequência de 44% (1995-1998) e de 87% (2001-2007), para *mt85C*, respectivamente (Beard *et al.* 2000; Van Hal *et al.* 2009). Qualquer uma destas frequências foi relativamente superior à encontrada para *mt85C* no presente estudo

(34%), ou em qualquer um dos outros três estudos publicados mais recentemente (Gupta *et al.* 2011; Dimonte *et al.* 2012; Esteves *et al.* 2012).

O **Gráfico 3** ilustra as frequências alélicas de distribuições dos SNPs *mt85C*, *mt85A* e *mt85T*, encontradas em diferentes populações de *P. jirovecii*, em diferentes países, ao longo dos anos.



**Gráfico 3.** Frequência (em %) das formas alélicas do SNP *mt85* (*mt85C*, *mt85A* e *mt85T*) do gene *mtLSU* rRNA em populações de isolados de *P. jirovecii* analisadas em diferentes regiões geográficas e em diferentes períodos de tempo. Informação retirada de: a. Miller *et al.* 2005b; b. Vopel *et al.* 2001; c. Beard *et al.* 2000; d. Esteves *et al.* 2010a; e. Esteves *et al.* 2011; f. Montes-Cano *et al.* 2004; g. Esteves *et al.* 2008; h. Esteves *et al.* 2010b; i. Van Hal *et al.* 2009; j. Esteves *et al.* 2012; k. Presente estudo; l. Gupta *et al.* 2011; m. Dimonte *et al.* 2012.

Pela análise do gráfico, que ilustra o que já foi descrito anteriormente, verifica-se que o padrão de distribuição do SNP *mt85* de *mtLSU* rRNA, entre os anos de 1989 e 2007, independentemente da região, demonstrou sempre uma prevalência considerável de *mt85C*. Este padrão de distribuição poderá estar a alterar-se, com uma diminuição da incidência de *mt85C* em relação a *mt85A* e *mt85T*, o que favorece uma distribuição mais homogênea entre estes SNPs. Com isto, põe-se em evidência uma variação temporal

destas formas alélicas em diversas regiões geográficas. Contudo, a ausência de variação no padrão de distribuição, verificada, pelo menos ao longo de aproximadamente 18 anos, entre 1989 a 2007, é uma forte constatação para a estabilidade temporal deste *locus* genético (Miller *et al.* 2005b), e desta forma, a variação temporal aqui sugerida deverá ser cuidadosamente analisada em estudos futuros, principalmente a incidir em populações de isolados de *P. jirovecii* obtidas após o ano de 2007 (onde a mudança do padrão de distribuição alélica começou a ser verificada).

#### 4.3.2. Distribuição da frequência dos SNPs *SOD110* e *SOD215*

Na distribuição das frequências alélicas do gene *SOD*, para os SNPs seleccionados, *SOD110* e *SOD215*, verificou-se que *SOD110T* e *SOD215C* foram os mais frequentes, com frequências de 60% e 63%, seguidos por *SOD110C* e *SOD215T*, com frequências de 40% e 37%, respectivamente. Um padrão de distribuição idêntico foi igualmente verificado num estudo recente em Portugal, com frequências de 82% para *SOD110T* e de 74% para *SOD215C*, sendo os SNPs *SOD110C* e *SOD215T* os menos frequentes com frequências alélicas entre 18% e 29%, respectivamente (Esteves *et al.* 2012). Noutras regiões geográficas, como no Reino Unido e no Zimbabué, Miller *et al.* (2005a) também verificaram que *SOD110T* e *SOD215C* foram os SNPs detectados com maior frequência, com distribuições alélicas semelhantes à encontrada no presente estudo. *SOD110T* e *SOD215C* apresentaram uma frequência de 67%, enquanto para *SOD110C* e *SOD215T* foi registada uma frequência de 33% (Miller *et al.* 2005a). Num estudo de 2003, igualmente realizado em populações de isolados de *P. jirovecii* no Reino Unido, foi novamente verificado uma maior frequência de *SOD110T* e *SOD215C* em relação a *SOD110C* e *SOD215T* (Wakefield *et al.* 2003).

No entanto, o padrão de distribuição verificado acima, não foi encontrado noutros três estudos portugueses (Esteves *et al.* 2010a, 2010b, 2011). Dois artigos publicados no ano de 2010, evidenciam uma maior frequência (de aproximadamente 60%) para os SNPs *SOD110C* e *SOD215T* em relação a *SOD110T* e *SOD215C* (com frequências próximas de 40%) (Esteves *et al.* 2010a, 2010b). Em 2011, o mesmo autor verificou uma distribuição diferente, com uma frequência superior de 53% e 54% para

os SNPs *SOD110C* e *SOD215C*, respectivamente, e com frequências menores, entre 47% e 46%, para *SOD110T* e *SOD215T*, respectivamente (Esteves *et al.* 2011).

Em termos genotípicos, neste estudo, foram identificadas as quatro combinações de genótipos – *SOD110C-SOD215T*, *SOD110T-SOD215C*, *SOD110T-SOD215T* e *SOD110C-SOD215C* – também detectadas anteriormente, em estudos efectuados em isolados de *P. jirovecii* em Portugal (Esteves *et al.* 2010a, 2010b, 2011, 2012). Outro dado interessante é que os genótipos *SOD110T-SOD215T* e *SOD110C-SOD215C*, não foram identificados noutros estudos com isolados de *P. jirovecii* de regiões geográficas distintas, nomeadamente no Zimbabué e no Reino Unido (Miler *et al.* 2003, 2005a; Wakefield *et al.* 2003), sugerindo uma provável diferença na distribuição de genótipos do locus SOD de *P. jirovecii* em termos geográficos, entre as populações de *P. jirovecii* em Portugal e as populações de *P. jiroveccii* estudadas no Reino Unido e no Zimbabué (Esteves *et al.* 2010b, 2011). Contudo, o considerável número de isolados analisados nos estudos portugueses, em comparação com os restantes estudos efectuados até ao momento para o gene SOD, poderá ter influenciado a identificação dos genótipos *SOD110T-SOD215T* e *SOD110C-SOD215C* que poderão ser menos representativos na população de *P. jirovecii*.

A presença dos genótipos *SOD110T-SOD215T* e *SOD110C-SOD215C* na população de isolados de *P. jirovecii* aqui caracterizada, é um dado a favor para a provável variação na distribuição geográfica em termos genotípicos. Estudos envolvendo um maior número de amostras, com populações de outras áreas geográficas, poderão trazer novos dados relevantes acerca deste padrão genotípico encontrado em Portugal.

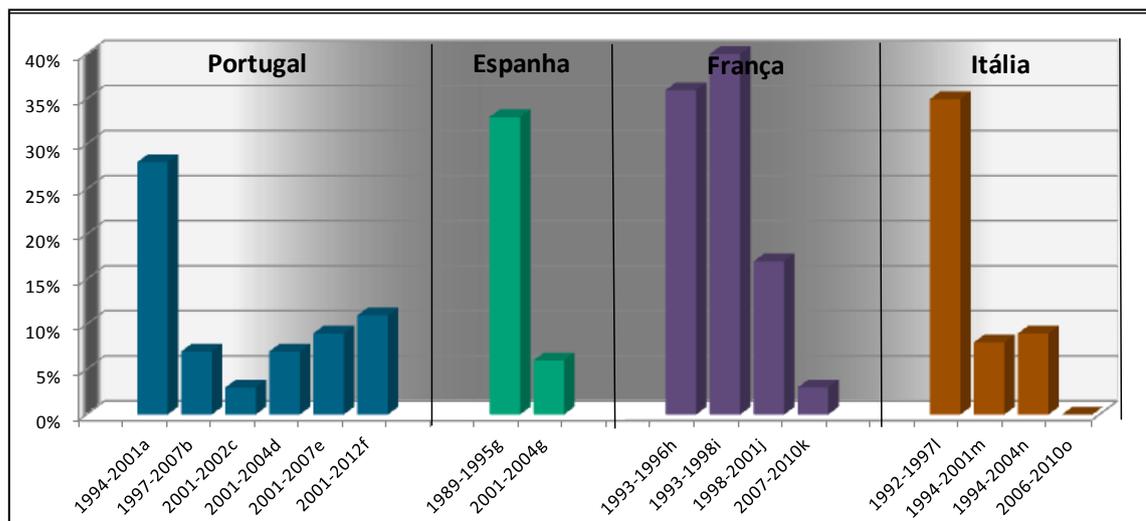
#### **4.3.3. Distribuição da frequência dos SNPs *DHPS165* e *DHPS171***

As distribuições de frequências dos SNPs *DHPS165* e *DHPS171*, encontradas na população de isolados de *P. jirovecii* neste estudo, a partir de amostras recolhidas num período de tempo entre 2001 e 2012, demonstraram uma frequência de 90% para as formas alélicas *DHPS165A* e *DHPS171C* e de 10% para as variações mutantes *DHPS165G* e *DHPS171T*. Em termos genotípicos, verificou-se que 89% dos isolados caracterizados apresentavam apenas o genótipo *wild-type* (*DHPS165A/DHPS171C*), em

contraste com os restantes que apresentavam genótipos mutantes ou mistos, sendo, portanto, a frequência de detecção de polimorfismos nas posições nucleotídicas 165 e 171 do gene DHPS de 11%. Esta frequência é relativamente semelhante à frequência de genótipos mutantes em DHPS, encontrada no estudo prévio (13%), realizado em isolados obtidos entre 1995 e 2011; sendo ligeiramente superior à frequência (entre 3% a 9%) detectada em estudos realizados em Portugal em isolados obtidos entre 1997 e 2007 (Costa *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b). No entanto, ainda é consideravelmente inferior à frequência (28%) obtida no primeiro estudo sobre o gene DHPS realizado em Portugal, para um período de tempo anterior, com mais de 10 anos de diferença, entre 1994 e 2001 (Costa *et al.* 2003). Em Espanha, um estudo de 2010 aponta para a mesma tendência. Alvarez-Martínez *et al.* (2010), no período de tempo entre os anos de 1989 e 1995, verificaram uma frequência de genótipos mutantes de 33% e, entre 2001 e 2004 constataram uma diminuição bastante acentuada (cerca de 80%), para uma frequência de genótipos mutantes estimada de 6%.

Por comparação com os resultados obtidos na Península Ibérica, verifica-se igualmente um declínio acentuado da prevalência de genótipos mutantes (*DHPS165G-DHPS171T*) noutros países Europeus. Em França, os primeiros estudos efectuados, verificaram uma frequência de genótipos mutantes entre 36 e 40%, para o período entre 1993 e 1998 (Santos *et al.* 1999; Nahimana *et al.* 2003); uma diminuição para 17% foi constatada para o período de tempo seguinte, entre 1998 e 2001 (Latouche *et al.* 2003); e um último estudo publicado, referente a um período mais recente, entre 2007 e 2010, indicou uma frequência de genótipos mutantes em DHPS, de aproximadamente 3% (Le Gal *et al.* 2012). Em Itália, Visconti *et al.* (2001) indicaram uma frequência para genótipos mutantes em DHPS de 35% (1992-1997); uma frequência de 8-9% foi verificada entre 1994 e 2004 (Ma *et al.* 2002; Valerio *et al.* 2007); e um estudo publicado recentemente, não identificou isolados mutantes para DHPS, nas regiões nucleotídicas 165 e 171, entre isolados recolhidos a partir de amostras de secreções pulmonares entre 2006 e 2010 (Dimonte *et al.* 2012).

O **Gráfico 4** ilustra a frequência de genótipos mutantes em DHPS obtidas ao longo dos anos nos quatro países Europeus referidos anteriormente.



**Gráfico 4.** Frequência (em %) dos genótipos mutantes de DHPS para as posições nucleotídicas 165 e 171, em população de isolados de *P. jirovecii* analisadas em Portugal, Espanha, França e Itália e diferentes períodos de tempo. Informação retirada de: a. Costa *et al.* 2003; b. Esteves *et al.* 2010a; c. Costa *et al.* 2005; d. Esteves *et al.* 2008; e. Esteves *et al.* 2010b; f. Presente estudo; g. Alvarez-Martínez *et al.* 2010; h. Nahimana *et al.* 2003; i. Santos *et al.* 1999; j. Latouche *et al.* 2003; k. Le Gal *et al.* 2012; l. Visconti *et al.* 2001; m. Ma *et al.* 2002; n. Valerio *et al.* 2007; o. Dimonte *et al.* 2012.

O declínio da frequência de mutações em DHPS é claramente evidente pela análise do **Gráfico 4**, e muito provavelmente a diminuição na frequência de mutações estará relacionada com o período de estudo em causa. De facto, foi sugerido por alguns autores que, muito provavelmente, o decréscimo da prevalência de mutações em DHPS em isolados de *P. jirovecii* estudados em Portugal, e na Europa, esteja relacionado com a implementação da terapia HAART em 1996, e com a diminuição gradual verificada na utilização da profilaxia anti-PPc, com fármacos da família das sulfas (Ma *et al.* 2002; Costa *et al.* 2005; Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b; Alvarez-Martínez *et al.* 2010; Matos & Esteves *et al.* 2010a; Dimonte *et al.* 2012). Torna-se evidente que, apesar das mutações no gene DHPS serem relativamente frequentes após a implementação da HAART, estas foram mais comuns no período precedido por esta terapia combinada (Alvarez-Martínez *et al.* 2010). Porém, tratando-se de mutações potencialmente associadas com fenómenos de resistência às sulfas, a frequência de 11% detectada em Portugal (e a de 13% detectada no estudo prévio), pode ser um dado preocupante indicando que estes SNPs devem ser alvo de estudo e vigilância em trabalhos futuros.

Se abrangermos esta análise para outros países, verifica-se uma variação na ocorrência de tais genótipos mutantes, com frequências superiores às encontradas na

Europa. Nos E.U.A. este facto é bastante evidente, onde a distribuição de frequência para o genótipo mutante em questão, variou num intervalo de 35-81% entre o período de 1976 e 2002 (Kazanjian *et al.* 1998, 2000, 2004; Ma *et al.* 1999; Beard *et al.* 2000; Huang *et al.* 2000; Crothers *et al.* 2005; Matos & Esteves *et al.* 2010a). No período de tempo entre 1976 e 1997 foi constatada uma frequência de 35% (Kazanjian *et al.* 1998) e no período mais recente, entre 1997 e 2002 uma frequência de 81% foi verificada (Crothers *et al.* 2005).

Apesar de existir um provável padrão temporal de distribuição para a prevalência de mutações em DHPS, principalmente nas posições nucleotídicas 165 e 171, em Portugal e na maioria dos países Europeus, para outras regiões geográficas, como nos E.U.A., isto não é tão evidente, uma vez que a frequência de genótipos mutantes continua a ser muito elevada. Estes dados sugerem que, também, é muito provável, existir uma variação geográfica para os genótipos mutantes de DHPS, muito possivelmente devido a factores epidemiológicos intrínsecos que influenciam a circulação e transmissão de diferentes genótipos, como o uso diferenciado de fármacos da família das sulfas, que nos E.U.A. é muito mais frequente, o que pode conduzir a uma pressão selectiva maior sobre este gene (Visconti *et al.* 2001; Hauser *et al.* 2010; Matos & Esteves *et al.* 2010a; Dimonte *et al.* 2012).

#### 4.4. Diversidade genotípica nos isolados de *P. jirovecii* encontrada através da metodologia MPCR/SBE

Pela análise genética efectuada, a partir do estudo dos três *loci* independentes de *P. jirovecii*, mtLSU rRNA, SOD e DHPS, foi possível verificar a presença de 29 MLGs distintos, o que evidencia uma grande diversidade genotípica encontrada entre os isolados. A variedade genética observada com este estudo, está, em muito, relacionada com a elevada frequência observada (44%) de infecções mistas (presença de mais do que um genótipo numa determinada amostra de secreção pulmonar). Quinze por cento (15%) desta frequência deve-se à presença de mais do que dois genótipos, onde, em alguns casos, oito MLGs putativos foram identificados em apenas uma amostra. Por este facto, pode afirmar-se que a genotipagem *multilocus*, efectuada neste estudo, conduziu a resultados satisfatórios, caracterizando uma boa amostragem dos genótipos representativos existentes no ambiente pulmonar do hospedeiro, não só pela interpretação cuidadosa dos dados obtidos, mas sobretudo devido à utilização de uma metodologia altamente sensível e robusta, implementada através da técnica SBE.

Em relação à frequência de infecções mistas, e analisando os resultados de genotipagem obtidos em alguns estudos epidemiológicos (Beard *et al.* 2000; Nahimana *et al.* 2000; Hauser *et al.* 2001a; Helweg-Larsen *et al.* 2001; Vopel *et al.* 2001; Esteves *et al.* 2008, 2010a, 2010b; Gupta *et al.* 2011; Dimonte *et al.* 2012), verifica-se que esta também poderá depender da quantidade de regiões genómicas analisadas e da variabilidade genética associada a cada um dos *loci*, sendo portanto bastante variável (Beard *et al.* 2000; Helweg-Larsen *et al.* 2001). A título de exemplo, frequências de infecções mistas distintas, à observada neste estudo, com valores compreendidos entre 6% (Gupta *et al.* 2011), 18% (Beard *et al.* 2000) ou até mesmo a atingir os 77% (Hauser *et al.* 2001a), através da análise de uma, duas e quatro regiões genómicas variáveis de *P. jirovecii*, respectivamente, foram já reportadas por diferentes autores, em distintas populações de isolados de *P. jirovecii* estudadas noutras regiões geográficas.

A evidência de infecções mistas, indicativa de uma heterogeneidade de genótipos de *P. jirovecii* dentro do pulmão do hospedeiro (Helweg-Larsen *et al.* 2001; Gupta *et al.* 2011), pode ser devido, à presença de organismos heterozigóticos, à presença de variações em genes multicópia, ou à ocorrência de co-infecções (Nahimana

*et al.* 2000; Helweg-Larsen *et al.* 2001; Gupta *et al.* 2011). Em *P. jirovecii*, co-infecção por diferentes subtipos genéticos é normalmente a hipótese mais plausível (Nahimana *et al.* 2000). Este é um importante factor a ter em conta na dinâmica de transmissão da PPc, uma vez que organismos geneticamente diferentes poderão ter a capacidade de infectar um único hospedeiro; que alguns casos de PPc poderão ser provocados por mais do que um subtipo genético de *P. jirovecii*; e que as proporções dos genótipos poderão ser alteradas durante um mesmo episódio de PPc (Olsson *et al.* 1998; Hauser *et al.* 2001a).

#### **4.5. Provável importância epidemiológica da diversidade genética de *P. jirovecii* com parâmetros da infecção**

A relação entre os SNPs/MLGs identificados e os parâmetros demográficos e clínicos relacionados com PPC foi investigada neste estudo *multilocus*. Foram detectadas associações com carácter significativo relevante, e que suportam resultados prévios, obtidos por outros autores, confirmando a provável importância da diversidade genética de *P. jirovecii* com a intensidade e severidade da infecção. Estas e outras considerações serão referenciadas nas próximas secções deste capítulo (“4.4.1. Relação entre SNPs/MLGs e parâmetros demográficos” e “4.4.2. Relação entre SNPs/MLGs e parâmetros clínicos”).

##### **4.5.1. Relação entre múltiplos SNPs/MLGs e parâmetros demográficos**

Um dos intuitos deste trabalho foi tentar analisar a importância da distribuição alélica de determinados polimorfismos (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*) com algumas características demográficas disponibilizadas, como o género, grupo etário e estação do ano da colheita da amostra biológica.

A principal correlação estatística encontrada está relacionada com a distribuição do SNP *mt85* em diferentes épocas do ano, subdivididas nas quatro estações. *mt85C* foi significativamente mais frequente em isolados provenientes de amostras recolhidas entre os meses da Primavera (Março a Junho), em comparação com as outras duas formas alélicas, *mt85A* e *mt85T*. A distribuição de frequências de determinados MLGs, nomeadamente MLG5, MLG12 e MLG13, também foram estatisticamente associados com determinadas épocas climáticas do ano.

Tendo em conta apenas os MLG5 e MLG13, por serem mais representativos do que MLG12, que apresentou uma frequência relativamente baixa (de apenas 2%) na população de isolados estudada, constatou-se que, a distribuição de MLG5 foi mais frequente na Primavera, no entanto encontra-se estatisticamente relacionado com os meses entre Março a Dezembro (sendo estatisticamente menos frequente no Verão); e que MLG13 foi estatisticamente menos frequente no meses primaveris possuindo uma distribuição mais equitativa nas restantes estações do ano.

Pela análise pormenorizada do **Quadro XV** (disponível na secção “3.5 Genotipagem pela técnica SBE”, do capítulo “3. Resultados”), onde as características genéticas de cada MLG estão identificadas, verifica-se que MLG5 e MLG13 são geneticamente semelhantes. Apenas uma diferença entre eles, situada no SNP *mt85* foi detectada. MLG5 apresenta a forma alélica *mt85C* e MLG13 apresenta a forma alélica *mt85T*. Esta consideração genotípica realça ainda mais a importância estatística do SNP em causa com o parâmetro demográfico estudado. Este é o primeiro estudo que demonstra a importância de *mt85* com a distribuição sazonal das suas formas alélicas, sendo imprescindível efectuar novos estudos para constatar a eventual importância destas associações.

Em relação aos dados demográficos directamente relacionados com os doentes deste estudo, nomeadamente o género e os grupos etários, é de salientar apenas, que pela análise estatística efectuada, uma associação significativa entre *mt85T* e o género foi verificada, sendo esta forma alélica mais frequente entre doentes do sexo feminino, em comparação com *mt85C* e *mt85A*, mais frequentes no sexo masculino. Este padrão também é verificado nos restantes SNPs, onde uma das formas alélicas acaba por ser mais frequente em um dos géneros (*SOD110T*, *SOD215C*, *DHPS165G*, *DHPS171T* - mais comuns em doentes do sexo feminino; *SOD110C*, *SOD215T*, *DHPS165A*, *DHPS171C* - mais frequentes em doentes do sexo masculino), no entanto as diferenças de distribuição destes SNPs (*SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*) entre os géneros não é significativa, o que pode sugerir que a distribuição dos SNPs em relação ao género é efectuada de uma forma casual e aleatória. A única relação estatisticamente significativa encontrada neste estudo (*mt85T*/sexo feminino) deverá ser investigada em outros estudos, com um maior número de amostras, de forma a averiguar a verdadeira importância desta associação.

Em relação aos grupos etários não foi possível tirar conclusões, sendo evidente que nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada. No entanto, é de referir que dois estudos relativamente recentes demonstraram uma associação entre os SNPs *SOD110* e *SOD215* com faixas etárias específicas (Esteves *et al.* 2010b, 2011). Nesses estudos foi observado que, a maioria dos doentes, com idades compreendidas entre os 30 e os 39 anos se encontravam infectados com organismos de *P. jirovecii* que apresentavam uma combinação específica dos SNPs referidos, o genótipo

*SOD110C-SOD215T* (Esteves *et al.* 2011). Muito provavelmente, neste estudo, uma associação semelhante não foi encontrada porque a distribuição dos doentes pelos grupos etários foi relativamente desequilibrada com 95% dos doentes a serem incluídos no grupo etário III (indivíduos com idades compreendidas entre os 24 e os 64 anos de idade). De facto, considerando as faixas etárias específicas, definidas para o grupo etário III (**Gráfico 1**, secção “3.1. Características demográficas e clínicas da população em estudo” do capítulo “3. Resultados”) é possível verificar associações estatisticamente significativas, nomeadamente entre *mt85T* e a faixa etária entre os 55 e os 64 anos (a maioria dos indivíduos desta faixa etária (7/9; 78%;  $P=0,004$ ) se encontravam infectados com organismos de *P. jirovecii* que apresentavam a forma alélica *mt85T* no gene mtLSU rRNA). O que demonstra que uma subdivisão dos quatro grupos etários formados poderia permitir uma melhor análise dos dados para estratificar correctamente os grupos e, desta forma, averiguar correctamente a existência de associações.

Mais estudos epidemiológicos devem ser efectuados de forma a avaliar estes e outros parâmetros demográficos importantes.

#### **4.5.2. Relação entre SNPs/MLGs e parâmetros clínicos**

Os SNPs podem ser importantes marcadores moleculares para a infecção por *P. jirovecii* uma vez que poderão influenciar a capacidade patogénica do microrganismo, que poderá reflectir-se na intensidade e severidade da doença (Matos & Esteves 2010b; Esteves *et al.* 2011). Deste modo, SNPs específicos, encontrados em determinadas regiões genómicas de *P. jirovecii*, têm vindo a ser analisados em diferentes estudos epidemiológicos (Beard *et al.* 2000; Montes-Cano *et al.* 2004; Miller *et al.* 2005; Costa *et al.* 2006; Van Hal *et al.* 2009; Hauser *et al.* 2010; Esteves *et al.* 2011; Gupta *et al.* 2011; Dimonte *et al.* 2012) Este estudo não foi excepção, e os SNPs *mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*, foram também analisados tendo em vista a sua possível relação com os parâmetros clínicos da infecção por *P. jirovecii*.

Primeiramente, é importante referir que, do ponto de vista genético, as variações nucleotídicas caracterizadas nos SNPs *mt85*, *SOD110* e *SOD215* são polimorfismos silenciosos. Sendo portanto evidente que, tais variações não provocam alterações na

estrutura do rRNA (*mt85*), nem na sequência de aminoácidos (*SOD110* e *SOD215*), e que muito provavelmente não acarretam mudanças na função da proteína em questão (Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007; Esteves *et al.* 2010a, 2011). No entanto, variações sinónimas podem influenciar as estruturas secundárias do rRNA, podendo ter impacto na conformação e actividade ribossómica (Noller 1984). Por outro lado, os polimorfismos sinónimos podem conduzir a instabilidades no mRNA e influenciar a actividade da proteína formada (Faber *et al.* 2005; Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007; Kim & Misra 2007; Esteves *et al.* 2010a), interferindo em vários processos como, no mecanismo de *splicing*, relacionado com processamento e maturação do mRNA, no controlo e na regulação translacional, nos níveis de transcrição, no mecanismo de *folding* proteico, ou até mesmo podem causar alterações na função génica, pela combinação com polimorfismos não sinónimos (Faber *et al.* 2005; Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007; Kim & Misra 2007; Esteves *et al.* 2010a).

Considerando estas informações, é de todo plausível referir que, as variações nucleotídicas em *mt85* poderão, de alguma forma, ter influência na conformação ribossómica e na actividade translacional (Noller 1984; Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007). De forma semelhante, as variações encontradas nas posições nucleotídicas 110 e 215 em SOD poderão conduzir a um aumento, ou diminuição, dos níveis de proteínas a ser expressa, influenciando a quantidade e disponibilidade de proteína formada, ou até mesmo conduzir a alterações de especificidade, como resultado de associação com haplótipos funcionais (Faber *et al.* 2005; Kim & Misra 2007; Kimchi-Sarfaty *et al.* 2007).

As variações identificadas e localizadas nas posições nucleotídicas 165 e 171, do gene DHPS, de *P. jirovecii*, caracterizadas por *DHPS165G* e *DHPS171T*, são SNPs não sinónimos, mutações pontuais, que resultam em substituição directa de aminoácidos e consequentemente com alteração da constituição da enzima responsável por sintetizar DHPPP com PABA em 7,8-dihidropteroato (Matos & Esteves *et al.* 2010a). Estas variações moleculares alteram, muito provavelmente a estrutura e o rearranjo da proteína formada, implicando um efeito na ligação da enzima para com o substrato, bem como para o agente competitivo, alterando deste modo a cinética de ligação aos agentes sulfas (Ma *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2000; Matos & Esteves 2010a). Estas mutações, nos codões 55 (Thr→Ala) e 57 (Pro→Ser), podem indicar que

o gene DHPS está a sofrer uma pressão evolutiva positiva que poderá conduzir à resistência de *P. jirovecii* ao efeito de sulfas, por diminuição da afinidade para esta família de fármacos (Kazanjian *et al.* 2000; Valerio *et al.* 2007).

Torna-se evidente, a nível molecular, que estes cinco SNPs (*mt85*, *SOD110*, *SOD215*, *DHPS165* e *DHPS171*) encontrados no genoma de *P. jirovecii*, poderão, de algum modo, ter impacto na patogenicidade do microrganismo, o que os torna clinicamente importantes, e os confirma como alvos preferenciais para estudos moleculares, funcionando como marcadores genéticos de *P. jirovecii*.

Do ponto de vista clínico, a relação mais relevante identificada neste estudo foi a associação entre determinados SNPs/MLGs e a carga parasitária determinada para os isolados de *P. jirovecii* caracterizados. *mt85C*, *SOD110T* e *SOD215C* foram detectados com maior frequência entre isolados com carga parasitária baixa; *mt85A*, *mt85T*, *SOD110C*, *SOD215T*, e ainda as formas alélicas *DHPS165A* e *DHPS171T*, parecem estar relacionados com isolados que apresentaram carga parasitária alta.

A relação entre o SNP *mt85* e o parâmetro clínico referido foi fortemente constatada, com significado estatístico. *mt85C* foi significativamente mais frequente em isolados com carga parasitária baixa a moderada, e *mt85T* foi significativamente mais frequente com carga parasitária alta. Esta relação estatística já foi constatada noutros estudos (Esteves *et al.* 2011, 2012). Da mesma forma, associações significativas entre carga parasitária e os SNPs estudados para o gene SOD também foram verificadas recentemente (Esteves *et al.* 2011, 2012) e vão de encontro ao que foi sugerido neste estudo (*SOD110T* e *SOD215C*/carga parasitária baixa; *SOD110C* e *SOD215T*/carga parasitária alta).

A forte associação entre estes SNPs e a carga parasitária poderá estar relacionada com diferentes propriedades de determinados subtipos genéticos. Organismos geneticamente distintos poderão apresentar capacidades distintas de replicação e propagação, que poderão influenciar a sua patogenicidade e virulência, e uma explicação plausível, para tal, poderá ser uma provável combinação de haplótipos (Esteves *et al.* 2011). De facto, a análise estatística descritiva entre os MLGs e as informações clínicas dos doentes, permitiu encontrar correlações estatisticamente significativas entre MLGs específicos e o parâmetro carga parasitária. MLG5 foi mais

frequente em isolados com carga parasitária baixa, MLG9 foi associado com isolados com carga parasitária moderada, e MLG13 foi mais comum entre isolados com carga parasitária alta.

Estes SNPs poderão ser considerados marcadores genéticos preferenciais para a carga parasitária de *P. jirovecii* em episódios de PPc (Esteves *et al.* 2011, 2012), desde que mais estudos, com diferentes populações de isolados em diversas regiões geográficas sejam efectuados, de forma a realçar e a confirmar a relação, constantemente verificada nos estudos portugueses.

De forma sucinta, ainda a respeito dos SNPs nos *loci* mtLSU rRNA e SOD, verificou-se que, a forma alélica *mt85C* foi mais frequente em isolados de doentes que apresentaram uma evolução favorável do caso clínico de PPc; *mt85T* foi frequente entre isolados de doentes com casos clinicamente sugestivos para a PPc e com contagem de células TCD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>. Para os SNPs *SOD110* e *SOD215* foi verificada outra relação provavelmente relevante. *SOD215T* apresentou uma frequência considerável entre isolados de doentes com contagens de células TCD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>. No entanto, estas relações não possuíram uma constatação estatística significativa, sendo imprescindível efectuar outras investigações para verificar o interesse epidemiológico das relações mencionadas. Por outro lado, e em última análise, alguns dos estudos de associação efectuados para estes SNPs com parâmetros clínicos da infecção por *P. jirovecii* (Miller *et al.* 2005b; Esteves *et al.* 2010a, 2011, 2012; Gupta *et al.* 2011), verificaram uma provável relação com a evolução clínica dos casos de PPc (Esteves *et al.* 2010a, 2012). Deve-se referir que as associações estatisticamente significativas verificadas por Esteves *et al.* (2010a), nomeadamente as relações entre *mt85C/SOD215C* e evolução clínica favorável, não foram observadas no decorrer do presente estudo.

A escassa informação encontrada sobre os SNPs *mt85*, *SOD110* e *SOD215*, nomeadamente a informação relacionada com o tipo de abordagem epidemiológica utilizada neste estudo, e as diferenças observadas nos resultados obtidos, realçam a importância para que outros estudos, não apenas em Portugal, mas também em diferentes regiões geográficas, com um maior número de amostras, para uma melhor caracterização genética das populações, sejam conduzidos, de forma a clarificar a

relação destes SNPs com os parâmetros clínicos e de modo a avaliar e confirmar a implicação da variabilidade genética principalmente com a evolução clínica da infecção.

Por conseguinte, também foi verificado que as formas alélicas dos SNPs estudados em DHPS, *DHPS165* e *DHPS171*, foram mais frequentes entre isolados de doentes que apresentavam determinadas características. Contudo nenhuma associação estatística, com valor  $P \leq 0,05$ , foi verificada. *DHPS165G* foi unicamente caracterizado em doentes com diagnóstico clínico sugestivo para a PPc. *DHPS171T* foi apenas encontrado em doentes com contagem de células TCD4<sup>+</sup> inferiores a 50 células/mm<sup>3</sup>, parecendo também estar relacionado com uma evolução clínica negativa. Estas duas formas alélicas também foram mais frequentes entre isolados de doentes submetidos ao tratamento contra *P. jirovecii* (tratamento este maioritariamente efectuado com TMP-SMZ).

Estes resultados, apesar de não possuírem teor estatístico, ilustram de certa forma, os resultados publicados até a presente data. De facto, alguns estudos têm identificado a presença destas mutações pontuais em DHPS, principalmente em doentes com PPc que foram submetidos a profilaxia e/ou ao tratamento anti-*P. jirovecii* (Lane *et al.* 1997; Kazanjian *et al.* 1998, 2000; Ma *et al.* 1999; Santos *et al.* 1999; Beard *et al.* 2000; Huang *et al.* 2000; Matos & Esteves 2010a). Noutros estudos, a relação entre estas mutações e casos de PPc com uma evolução clínica desfavorável, tem vindo a ser constatada, principalmente em doentes seropositivos para VIH (Helweg-Larsen *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000). No entanto, ao longo dos últimos anos, resultados contraditórios têm sido produzidos, no que diz respeito à influência das mutações do gene DHPS na infecção por *P. jirovecii*, principalmente no que se refere à evolução clínica, sobrevivência dos doentes, e fenómenos de resistência (Alvarez-Martinez *et al.* 2008; Matos & Esteves *et al.* 2010a).

A primeira constatação de um impacto significativo na presença de mutações em DHPS na mortalidade de imunocomprometidos com PPc, foi verificada no final do século XX, num estudo epidemiológico realizado entre o período de 1989 e 1999 (Helweg-Larsen *et al.* 1999). Neste estudo as mutações em DHPS foram associadas com má evolução clínica da doença, sugerindo que este facto dever-se-ia a uma exposição prévia a fármacos da família das sulfas (Helweg-Larsen *et al.* 1999). Desta

forma a presença de mutações em DHPS pode ser um factor de prognóstico importante no contexto da evolução clínica, ou mesmo no que se refere à mortalidade (Helweg-Larsen *et al.* 1999, 2004). No entanto, autores de um estudo mais actual, realizado em doentes com PPc entre 2000 e 2004, foram incapazes de demonstrar a implicação destas mutações como prognóstico de PPc, e ainda verificaram que doentes infectados com microrganismos de *P. jirovecii* com mutações em DHPS não apresentaram evolução clínica pior em comparação com doentes infectados com isolados de *P. jirovecii* caracterizados como *wild-type* para o locus DHPS (Alvarez-Martinez *et al.* 2008). Mais recentemente, estes autores (Alvarez-Martinez *et al.* (2010)) encontraram diferenças epidemiológicas entre doentes com PPc antes e depois da introdução da terapia combinada (HAART), sugerindo que as alterações no perfil dos doentes imunocomprometidos com PPc, verificadas entre os dois períodos, poderá ser o principal factor a afectar o prognóstico da doença nos últimos anos nas populações, e que a presença de mutações em DHPS nada influencia o prognóstico da doença.

Da mesma forma, a nível clínico, a associação entre estes SNPs e a resistência aos fármacos da família das sulfas não é de todo simples e evidente (Kazanjian *et al.* 2000; Matos & Esteves *et al.* 2010a). Apesar de determinados estudos confirmarem, por associações significativas, o insucesso no uso de agentes sulfas, ou dapsona, em doses profiláticas e a presença de variações polimórficas em DHPS (Lane *et al.* 1997; Kazanjian *et al.* 1998, 2000; Ma *et al.* 1999; Armstrong *et al.* 2000; Beard *et al.* 2000; Matos & Esteves 2010a), outros demonstram que a maioria dos doentes com PPc, infectados por microrganismos *P. jirovecii* mutantes para o gene DHPS, submetidos a terapia anti-*P. jirovecii*, com TMP-SMZ, respondem bem ao tratamento (Crothers *et al.* 2005; Helweg-Larsen *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 1998, 2000, 2004; Matos & Esteves 2010a). Sugere-se que a exposição prolongada a um baixo nível de TMP-SMZ, ou dapsona, administrada durante a profilaxia, facilita a selecção de mutações, como as identificadas nos codões 55 e 57 do gene DHPS (Ma *et al.* 1999), e que estas podem conferir um certo nível de resistência (Kazanjian *et al.* 2004; Alvarez-Martinez *et al.* 2008). Sendo muito provável que, em concentrações superiores, às doses profiláticas, normalmente administradas no decorrer da terapêutica, o efeito inibitório adquirido seja perdido, o que resulta num sucesso do tratamento na maioria dos doentes infectados por *P. jirovecii* que apresentam os polimorfismos mutantes para as posições 165 e 171 do

gene DHPS (Armstrong *et al.* 2000; Kazanjian *et al.* 2000; Alvarez-Martinez *et al.* 2008).

É certo que o significado clínico da presença de mutações no gene da DHPS na resistência a fármacos permanece por esclarecer (Helweg-Larsen *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Matos & Esteves *et al.* 2010a), no entanto, estas mutações podem possuir um papel como marcadores genéticos da infecção (Helweg-Larsen *et al.* 1999). Os SNPs *DHPS165* e *DHPS171*, associados com mutações adicionais em outras regiões, poderão afectar a susceptibilidade de *P. jirovecii* aos fármacos utilizados, conferindo, deste modo, um nível elevado de resistência. Esta resistência em *P. jirovecii* poderá portanto estar relacionada com genótipos específicos e a sua identificação poderá provavelmente evidenciar o mecanismo genético que confere tal resistência (Helweg-Larsen *et al.* 1999; Hauser *et al.* 2001b; Latouche *et al.* 2003).

Estudos futuros devem ser conduzidos, com populações mais representativas, para melhor caracterizar a importância deste *locus* no desenvolvimento de resistência, e relativamente a outros parâmetros clínicos particularmente importantes. Em paralelo, medidas alternativas à profilaxia e terapêutica existentes para PPC devem ser consideradas (Helweg-Larsen *et al.* 1999; Kazanjian *et al.* 2000; Esteves *et al.* 2008).

#### 4.6. Análise de associações não aleatórias entre os SNPs - desequilíbrio de ligação

A genotipagem *multilocus* também permitiu efectuar uma análise cruzada entre os SNPs em estudo. A partir desta abordagem, foi possível estabelecer associações estatísticas, com valor significativo, principalmente entre os SNPs caracterizados nos *loci* SOD (*SOD110* e *SOD215*) e DHPS (*DHPS165* e *DHPS171*).

*SOD110T* foi relacionado estatisticamente com *SOD215C*, sendo *SOD110C* associado com *SOD215T*; *DHPS165A* foi correlacionado com *DHPS171C*, enquanto *DHPS165G* foi associado com *DHPS171T*. Especificamente, *SOD110T-SOD215C*, *SOD110C-SOD215T*, *DHPS165A-DHPS171C* e *DHPS165G-DHPS171T* foram as combinações de haplótipos mais frequentes.

A respeito dos haplótipos no gene SOD, estes resultados corroboram a hipótese de uma provável associação de *SOD110T* com *SOD215C* e *SOD110C* com *SOD215T*, que apesar de já ter sido sugerida por outros autores (Miller *et al.* 2005a; Esteves *et al.* 2010a, 2011, 2012), não era tão evidente. Pelo contrário, os haplótipos menos frequentes, *SOD110T-SOD215T* e *SOD110C-SOD215C*, não se encontravam correlacionados. Ainda neste estudo foi possível demonstrar estatisticamente, que os haplótipos *SOD110T-SOD215C* e *SOD110C-SOD215T* encontravam-se em desequilíbrio de ligação, o que evidencia prováveis associações não aleatórias entre estes SNPs, *SOD110* e *SOD215*, nos isolados caracterizados. Tendo também em atenção as informações referentes à análise de associação efectuada para os SNPs *DHPS165* e *DHPS171*, estas suportam uma forte combinação entre os haplótipos *DHPS165A-DHPS171C* e *DHPS165G-DHPS171T* em relação a *DHPS165A-DHPS171T* e *DHPS165G-DHPS171C*. Assim, foi também demonstrado que os SNPs nas posições nucleotídicas 165 e 171 do gene DHPS poderão estar em desequilíbrio de ligação. Estas associações não-aleatórias poderão indicar que, a presença de apenas um dos SNPs não sinónimos (*DHPS165G* ou *DHPS171T*), presentes na combinação de haplótipos *DHPS165G-DHPS171C* ou *DHPS165A-DHPS171T*, podem ser desvantajosas, coduzindo a um custo de *fitness* elevado para o microrganismo.

O fenómeno genético de associação não-aleatória entre SNPs, também poderá estar a ocorrer noutros *loci*, para além dos referidos neste trabalho, podendo muitas das

regiões genómicas de *P. jirovecii* estarem associadas em desequilíbrio de ligação. De facto, este tipo de análise, efectuado noutros estudos, demonstraram associações significativas entre SNPs em mtLSU rRNA, incluindo *mt85*, e genótipos específicos em outros *loci* de *P. jirovecii* (Esteves *et al.* 2010a; Esteves *et al.* 2010b).

É de considerar que, quando determinados SNPs parecem estar fortemente associados, como acontece com os SNPs referidos em SOD e DHPS, a genotipagem de apenas um deles poderá prever com exatidão o genótipo do SNP associado (Crawford & Nickerson 2005), o que indica que a caracterização de um único SNP poderá ser suficiente para identificar um haplótipo em desequilíbrio de ligação. A implementação deste tipo de abordagem em estudos futuros poderá ser muito útil. Para além de facilitar o processo e simplificar a análise da genotipagem, poderá também trazer vantagens em termos de custo-benefício (Meng *et al.* 2004).

Se for possível definir melhor o conjunto de SNPs para efectuar a genotipagem *multilocus*, isso não só permitirá o conhecimento da existência de vários haplótipos no genoma, como também permitirá a aquisição de uma grande quantidade de informação sobre a variabilidade genética de determinado subtipo genético de *P. jirovecii* (Meng *et al.* 2004).

#### 4.7. Abordagem populacional - estudo da clonalidade da espécie *P. jirovecii*

A aplicação de um método combinatório padrão, usualmente reconhecido como o teste d1, foi efectuada neste estudo *multilocus*. O cálculo estatístico foi implementado a partir dos resultados obtidos pela análise dos MLGs putativos, presentes no conjunto de isolados de *P. jirovecii* estudados. O principal objectivo desta abordagem genética populacional foi o de constatar prováveis desvios à distribuição panmítica de genótipos na população.

Apesar de ter sido observada elevada probabilidade de existência de recombinação entre a maioria dos MLGs de *P. jirovecii*, os valores significativos obtidos pelo teste indicam que dois MLGs, nomeadamente MLG7 e MLG9, encontram-se sobre-representados na população, possuindo frequências de distribuição superiores àquela que seria de esperar. Considerando que a presença de determinado MLG em excesso, é uma forte indicação de propagação clonal, pode-se sugerir que, MLG7 e MLG9 estão a ser replicados como entidades genéticas únicas, sem a ocorrência de recombinação aleatória entre genes (Tibayrenc *et al.* 1991; Esteves *et al.* 2010b).

Estes resultados suportam a hipótese de que na espécie *P. jirovecii* a recombinação genética é frequente, sendo um fenómeno representativo, contudo, ocasionalmente, surge um subtipo genético que, ao aumentar a sua frequência muito rapidamente na população, torna-se num clone estável por longos períodos de tempo (Tibayrenc *et al.* 1990, 1991; Smith *et al.* 1993; Esteves *et al.* 2010b). Como sugerido, para outros microrganismos patogénicos, muito provavelmente, os organismos pertencentes a esta espécie, constituem populações com uma estrutura epidémica (Smith *et al.* 1993; Esteves *et al.* 2010b).

Clones epidémicos, em populações de *P. jirovecii*, poderão ter consequências importantes a nível clínico da infecção, e a sua caracterização genética poderá ser epidemiologicamente muito importante (Tibayrenc *et al.* 1990, 1991). Estes clones, eventualmente poderão apresentar propriedades biológicas vantajosas, que por sua vez, poderão influenciar a capacidade patogénica do microrganismo, tendo efeito no fenómeno de infecção (Tibayrenc *et al.* 1990, 1991).

#### 4.8. Aplicabilidade da metodologia MPCR/SBE

O desenvolvimento de metodologias de alto rendimento com vista a caracterização genética, é crucial para o estudo de organismos patogénicos como *P. jirovecii* (Helweg-Larsen 2004), onde a ausência de crescimento sustentável *in vitro* dificulta consideravelmente o seu estudo a partir de técnicas convencionais (Sandubete *et al.* 2011). Como foi referido anteriormente, vários métodos de tipificação moleculares tem vindo a ser aplicados para a abordagem genética de *P. jirovecii* (Lu *et al.* 1995; Hauser *et al.* 1997, 1998, 2001a; Beard *et al.* 2004; Ripamonti *et al.* 2009; Esteves *et al.* 2011). Neste estudo esta abordagem foi efectuada através da metodologia MPCR/SBE, indicada para a caracterização de múltiplos polimorfismos.

A partir da análise dos resultados, foi verificado que a metodologia molecular aplicada poderá ser imprescindível para a genotipagem *multilocus* em *P. jirovecii*, uma vez que proporciona melhor compreensão da variabilidade genética existente neste microrganismo, de uma forma bastante adequada, robusta, reproduzível e eficiente (Esteves *et al.* 2011). Foi também confirmado que a vasta informação genética adquirida neste tipo de metodologia, poderá ser altamente útil como auxílio na compreensão da epidemiologia da infecção, onde o conhecimento apreendido poderá trazer novas estratégias para a prevenção da doença, conduzindo também a melhores medidas nos sistemas de prognóstico da PPc (Esteves *et al.* 2011; Sandubete *et al.* 2011).

A relevância epidemiológica desta técnica de genotipagem *multilocus*, poderá estar maioritariamente relacionada com a caracterização de perfis epidemiológicos em *P. jirovecii*. A implementação da técnica MPCR/SBE verificou-se ser de grande utilidade para a identificação de SNPs, de modo fácil, sensível e específico, associados com determinados parâmetros clínicos, que poderão auxiliar na caracterização de subtipos genéticos, com propriedades biológicas e patogénicas importantes para a infecção por *P. jirovecii* (Esteves *et al.* 2011, 2012).

Pretende-se, num futuro próximo, confirmar a importância epidemiológica de variações em subtipos de *P. jirovecii* e verificar o verdadeiro impacto clínico de determinados SNPs, haplótipos e/ou MLGs. A abordagem *multilocus* com a metodologia MPCR/SBE deverá ser implementada em estudos multicêntricos,

envolvendo um grande número de amostras de diferentes regiões geográficas, de forma a confirmar e comparar resultados, e a aplicar o conhecimento gerado em diferentes populações de risco. Deste modo, a técnica MPCR/SBE poderá, muito provavelmente, ser utilizada como metodologia de diagnóstico complementar da PPc, com vista a tirar partido do seu potencial para identificar organismos de *P. jirovecii* potencialmente implicados com determinados parâmetros da infecção. Podendo ser um dos factores a considerar durante o processo de decisão clínica e escolha adequada para o tratamento da PPc, principalmente em casos que apresentam organismos mais virulentos e/ou resistentes (Esteves *et al.* 2011, 2012).

---

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- ALIOUAT-DENIS, C.M. CHABÉ, M. DEMANCHE, C. ALIOUAT, E.M. VISCOGLIOSI, E. GUILLOT, J. DELHAES, L. & DEI-CAS, E. (2008) *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution*, 8 (5), pp. 708-726.
- ALIOUAT-DENIS, C.M. MARTINEZ, A. ALIOUAT, E.M. POTTIER, M. GANTOIS, N. & DEI-CAS, E. (2009) The *Pneumocystis* life cycle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (3), pp. 419-426.
- ALVAREZ-MARTÍNEZ, M.J. MIRÓ, J.M. VALLS, M.E. MAS, J. BELLACASA, J.P. SUED, O. SOLÉ, M. RIVAS, P. V. LAZZARI, E. BENITO, N. GARCÍA, F. AGUSTÍ, C. WILSON, P.E. . GATELL, J.M. ANTA, M.T.J. MESHNICK, S.R. & MORENO, A. (2010) Prevalence of dihydropteroate synthase genotypes before and after the introduction of combined antiretroviral therapy and their influence on the outcome of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-1–infected patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68, pp. 60-65.
- AN, C.L. GIGLIOTTI, F. & HARMSSEN, A.G. (2003) Exposure of immunocompetent adult mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* by cohousing: growth of *P. carinii* f. sp. *muris* and host immune response. *Infection and Immunity*, 71 (4), pp. 2065-2070.
- ARMSTRONG, W. MESHNICK, S. & KAZANJIAN, P. (2000) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes and Infection*, 2 (1), pp. 61-67.
- BARRY, S.M. & JOHNSON, M.A. (2001) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV Medicine*, 2 (2), pp. 123-132.
- BASSELIN, M. HUNT, S.M. ABDALA-VALENCIA, H. & KANESHIRO, E.S. (2005) Ubiquinone synthesis in mitochondrial and microsomal subcellular fractions of *Pneumocystis* spp.: differential sensitivities to atovaquone. *Eukaryotic Cell*, 4 (8), pp. 1483-1492.
- BEARD, C.B. & NAVIN, T.R. (1996) Molecular epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 2 (2), pp. 147-150.
- BEARD, C.B. CARTER, J.L. KEELY, S.P. HUANG, L. PIENIAZEK, N.J. MOURA, I. N.S. ROBERTS, J.M. HIGHTOWER, A.W. BENS, M.S. FREEMAN, A.R. LEE, S.

- STRINGER, J.R. DUCHIN, J.S. DEL RIO, C. RIMLAND, D. BAUGHMAN, R.P. LEVY, D.A. DIETZ, V.J. SIMON, P. & NAVIN, T.R. (2000) Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerging Infectious Diseases*, 6 (3), pp. 265-272.
- BEARD, C.B. ROUX, P. NEVEZ, G. HAUSER, P.M. KOVACS, J. A. UNNASCH, T.R. & LUNDGREN, B. (2004) Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (10), pp. 1729-1735.
- BECK, J.M. & CUSHION, M.T. (2009) *Pneumocystis* workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryotic Cell*, 8 (4), pp. 446-460.
- BOOM, R. SOL, C.J.A. SALIMANS, M.M.M. JANSEN, C.L. WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E. & VAN DER NOORDAA, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (3), pp. 495-503.
- CALDERÓN, E. J. (2009) Epidemiology of *Pneumocystis* infection in human. *Journal of Medical Mycology*, 19 (4), pp. 270-275.
- CALDERÓN, E.J. GUTIÉRREZ-RIVERO, S. DURAND-JOLY, I. & DEI-CAS, E. (2010) *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8 (6), pp. 683-701.
- CARINI, A. (1910) Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. *Boletim da Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo*, 18 (8), pp. 204.
- CASTRO, J.G. & MORRISON-BRYANT, M. (2010) Management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV infected patients: current options, challenges and future directions. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*, 2, pp. 123-134.
- CATHERINOT, E. LANTERNIER, F. BOUGNOUX, M.E. LECUIT, M. COUDERC, L.J. & LORTHOLARY, O. (2010) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Infectious Disease Clinics of North America*, 24 (1), pp. 107-138.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2009) Life cycle. [WWW]. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Pneumocystis.htm>. [15/12/2011].

- CERÉ, N. POLACK, B. CHANTELOUP, N.K. & COUDERT, P. (1997) Natural transmission of *Pneumocystis carinii* in nonimmunosuppressed animals: early contagiousness of experimentally infected rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (10), pp. 2670-2672.
- CHAGAS, C. (1909) Nova tripanosomiase humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1 (2), pp. 159-218.
- CHAMBERLAIN, J.S. GIBBS, R.A. RANIER, J.E. NGUYEN P.N. & CASKEY, C.T. (1988) Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16 (23), pp. 11141- 11156.
- CHEN, X. & SULLIVAN, P.F. (2003) Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The Pharmacogenomics Journal*, 3, pp. 77-96.
- COSTA, M.C. ESTEVES, F. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2006) Genetic characterization of the dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (6), pp. 1246-1249.
- COSTA, M.C. GASPAR, J. MANSINHO, K. ESTEVES, F. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2005) Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37 (10), pp. 766-771.
- COSTA, M.C. HELWEG-LARSEN, J. LUNDGREN, B. ANTUNES, F. & MATOS, O. (2003) Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from portuguese patients with *Pneumocystis pneumonia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, pp.516-520.
- Crawford, D.C. & Nickerson, D.A. (2005) Definition and clinical importance of haplotypes. *Annual Review of Medicine*, 56, pp.303-320.
- CROTHERS, K. BEARD, C.B. TURNER, J. GRONER, G. FOX, M. MORRIS, A. EISER, S. & HUANG, L. (2005) Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis pneumonia* containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS*, 19(8), pp. 801-805.

- CUSHION, M.T. (2004) *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. *Trends in Microbiology*, 12 (5), pp. 243-249.
- CUSHION, M.T., COLLINS, M. HAZRA, B. & KANESHIRO, E.S. (2000) Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (3), pp. 713-719.
- DELANOE, P., & DELANOE, M. (1912) Sur les rapports des kystes de Carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisii*. *C.R. Académie des Sciences Paris*, 155, pp. 658-660.
- DENIS, C.M. GUYOT, K. WAKEFIELD, A.E. DIVE, D. DEI-CAS, E. CAMUS, D. ODBERG-FERRAGUT, C. (1998) Molecular cloning and characterization of a superoxide dismutase (sod) gene in *Pneumocystis jirovecii*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45 (5), pp. 475-483.
- DENIS, C.M. MAZARS, E. GUYOT, K. ODBERG-FERRAGUT, C. VISCOGLIOSIS, E. DEI-CAS, E. & WAKEFIELD, A.E. (2000) Genetic divergence at the SODA locus of six different formae specialis of *Pneumocystis carinii*. *Medical Mycology*, 38 (4), pp. 289-300.
- DIMONTE, S. BERRILLI, F. ORAZI, C. ALFONSO, R. PLACCO, F. BORDI, E. PERNO, C.F. & CAVE, D. (2012) Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infection, Genetics and Evolution*, (November), pp. 1-5.
- DURAND-JOLY, I. CHABÉ, M. SOULA, F. DELHAES, L. CAMUS, D. & DEI-CAS, E. (2005) Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45 (3), pp. 405-410.
- EDMAN, J.C. KOVACS, J.A. MASUR, H. SANTI, D.V. ELWOOD, H.J. & SOGIN, M.L. (1988) Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334, pp. 519-522.
- ELNIFRO, E.M. ASHSHI, A.M. COOPER, R.J. & KLAPPER, P.E. (2000) Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13 (4), pp. 559-570.

- ELVIN, K.M. BJORKMAN, A. LINDER, E. HEURLIN, N. & HJERPE, A. (1988) *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *British Medical Journal*, 297 (6645), pp. 381-384.
- ERIKSSON, O.E. (1994) *Pneumocystis carinii* a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). *Systema Ascomycetum*, 13, pp. 165-180.
- ESTEVEES, F. GASPAR, J. MARQUES, T. LEITE, R. ANTUNES, F. MANSINHO, K. & MATOS, O. (2010a) Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (7), pp. 878-884.
- ESTEVEES, F. GASPAR, J. SOUSA, B. ANTUNES, F. MANSINHO, K. & MATOS, O. (2012) *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: a new approach for clinical and epidemiological studies. *Clinical Microbiology and Infection*, 18 (6), pp. E177-E184.
- ESTEVEES, F. GASPAR, J. SOUSA, B. ANTUNES, F. MANSINHO, K. & MATOS, O. (2011) Clinical relevance of multiple single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: development of a multiplex PCR-single-base-extension methodology. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (5), pp. 1810-1815.
- ESTEVEES, F. GASPAR, J. TAVARES, A. MOSER, I. ANTUNES, F. MANSINHO, K. & MATOS, O. (2010b) Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infections, Genetics and Evolution*, 10 (2), pp. 192-199.
- ESTEVEES, F. MONTES-CANO, M.A. HORRA, C. COSTA M.C. CALDERÓN, E.J. & ANTUNES, F. (2008) *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clinical Microbiology Infection*, 14 (4), pp. 367-362.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2011) HIV/AIDS surveillance in Europe 2010 – Surveillance report. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe.

- FABER, A. FERREIRA, G.N.M. SILVA, S.N. RUEFF, J. & GASPAR, J. (2005) Multiplex PCR–single-base extension genotyping of multiple glutathione S-transferase polymorphisms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 41 (1), pp. 9-15.
- FISHER, N. & MEUNIER, B. (2008) Molecular basis of resistance to cytochrome bc<sub>1</sub> inhibitors. *FEMS Yeast Research*, 8 (2), pp. 183–192.
- FLORI, P. BELLETE, B. DURAND, F. RABERIN, H. CAZORLA, C. HAFID, J. LUCHT, F. & SUNG, R.T.M. (2004) Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (7), pp. 603-607.
- FRÉALLE, E. NOEL, C. NOLARD, N. SYMOENS, F. FELIPE, M.S. DEI-CAS, E. CAMUS, D. VISCOGLIOSI, E. & DELHAES, L. (2006) Manganese superoxide dismutase based phylogeny of pathogenic fungi. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41 (1), pp. 28-38.
- FUJII, T. NAKAMURA, T. & IWAMOTO, A. (2007) *Pneumocystis* pneumonia in patients with HIV infection: clinical manifestations, laboratory findings, and radiological features. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 13 (1), pp. 1-7.
- FUJISAWA, T. SUDA, T. MATSUDA, H. INUI, N. NAKAMURA, Y. SATO, J. TOYOSHIMA, M. NAKANO, Y. YASUDA, K. GEMMA, H. HAYAKAWA, H. CHIDA, K. (2009). Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirology*, 14 (2), pp. 203-209.
- GILL, V.J. EVANS, G. STOCK, F. PARRILLO, J.E. MASUR, H. & KOVACS, J.A. (1987) Detection of *Pneumocystis carinii* by fluorescent-antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 25 (10), pp. 1837-1840.
- GUPTA, R. MIRDHA, B.R. GULERIA, R. AGARWAL, S.K. SAMANTARAY, J.C. KUMAR, L. KABRA, S.K. LUTHRA, K. SREENIVAS, V. LYER, V.K. Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at

- mitochondrial large subunit rRNA. *International Journal of Medical Microbiology*, 301: pp. 267-272.
- HAUSER, P.M. BLANC, D.S. BILLE, J. & FRANCIOLI, P. (1998) III. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 27-35.
- HAUSER, P.M. BLANC, D.S. SUDRE, P. MANOLOFF, E.S. NAHIMANA, A. BILLE, J. WEBER, R. FRANCIOLI, P. & THE STUDY GROUP. (2001a) Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and –negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS*, 15 (4), pp. 461-466.
- HAUSER, P.M. FRANCIOLI, P. BILLE, J. TELENTI, A. & BLANC, D.S. (1997) Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (12), pp. 3086–3091.
- HAUSER, P.M. NAHIMANA, A. TAFFE, P. WEBER, R. FRANCIOLI, P. BILLE, J. & RABODONIRINA, M. (2010). Interhuman transmission as a Potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. *Clinical Infections Diseases*, 51 (4), pp. e28-e33.
- HAUSER, P.M. SUDRE, P. NAHIMANA, A. FRANCIOLI, P. & THE STUDY GROUP. (2001b) Prophylaxis failure is associated with a specific *Pneumocystis carinii* genotype. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (7), pp. 1080– 1082.
- HELWEG-LARSEN, J. (2004) *Pneumocystis jirovecii*. *Danish Medical Bulletin*, 51 (3), pp. 251-273.
- HELWEG-LARSEN, J. BENFIELD, T.L. EUGEN-OLSEN, J. LUNDGREN, J.D. & LUNDGREN, B. (1999) Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *The Lancet*, 354 (9187), pp. 1347-1351.
- HELWEG-LARSEN, J. LUNDGREN, B. & LUNDGREN, J.D. (2001) Heterogeneity and compartmentalization of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* genotypes in autopsy lungs. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (10), pp. 3789-3792.

- HENEGARIU, O. HEEREMA, N.A. DLOUHY, S.R. VANCE, G.H. & VOGT, P.H. (1997) Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23 (3), pp. 504-511.
- HILL, P. KESSL, J. FISHER, N. MESHNICK, S. TRUMPOWER, B.L. & MEUNIER, B. (2003) Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome b mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jiroveci*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (9), pp. 2725–2731.
- HIRSCHHORN, J.N. SKLAR, P. LINDBLAD-TOH, K. LIM, Y.E. RUIZ-GUTIERREZ, M. BOLK, S. LANGHORST, B. SCHAFFNER, S. WINCHESTER, E. & LANDER, E.S. (2000) SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (22), pp. 12164-12169.
- HUANG, L. BEARD, C.B. CREASMAN, J. LEVY, D. DUCHIN, J.S. LEE, S. PIENIAZEK, N. CARTER, J.L. DEL RIO, C. RIMLAND, D. & NAVIN, T.R. (2000) Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *The Journal of Infectious Diseases*, 182, pp. 1192-1198.
- HUANG, L. CATTAMANCHI, A. DAVIS, J.L. BOON, S. KOVACS, J. MESHNICK, S. MILLER, R.F., WALZER, P.D. WORODRIA, W. MASUR, H. ON BEHALF OF THE INTERNATIONAL HIV-ASSOCIATED OPPORTUNISTIC PNEUMONIAS (IHOP) STUDY & THE LUNG HIV STUDY. (2011) HIV-Associated *Pneumocystis pneumonia*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8 (3), pp. 294-300.
- HUANG, L. MORRIS, A. LIMPER, A.H. BECK, J.M. & ON BEHALF OF THE ATS PNEUMOCYSTIS WORKSHOP PARTICIPANTS (2006) An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in *Pneumocystis pneumonia* (PCP). *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3 (8), pp. 655-664.
- HUGHES, W.T. (1982) Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 145 (6), pp. 842-848.
- HUGHES, W.T. (2001) *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 12 (4), pp. 309-314.

- JARBOUI, M.A. SELLAMI, A. SELLAMI, H. CHEIKHROUHOU, F. MAKNI, F. ARAB, N.B. JEMAA, M.B. & AYADI, A. (2009) Molecular diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in immunocompromised patients. *Mycoses*, 53(4), pp. 329-333.
- KANESHIRO, E.S. & LIMPER, A.H. (2011) *Pneumocystis*. *Encyclopedia of Life Sciences*, (August), pp. 1-10.
- KANESHIRO, E.S. (2001) Are cytochrome b gene mutations the only cause of atovaquone resistance in *Pneumocystis*? *Drug Resistance Updates*, 4 (5), pp. 322-329.
- KANESHIRO, E.S. BASSELIN, M. MERALI, S. & KAYSER, O. (2006) Ubiquinone synthase and its regulation in *Pneumocystis carinii*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 (6), pp. 435-444.
- KANESHIRO, E.S. SUL, D. & HAZRA, B. (2000) Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on ubiquinone biosynthesis in *Pneumocystis carinii* organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (1), pp. 14-18.
- KAPLEY, A. LAMPEL, K. & PUROHIT, H.J. (2000) Thermocycling steps and optimization of multiplex PCR. *Biotechnology Letters*, 22 (24), pp. 1913-1918.
- KAZANJIAN, P. ARMSTRONG, W. HOSSLER, P.A. BURMAN, W. RICHARDSON, J. LEE, C.H. CRANE, L. KATZ, J. & MESHNICK, S.R. (2000) *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 182 (2), pp. 551-557.
- KAZANJIAN, P. ARMSTRONG, W. HOSSLER, P.A. HUANG, L. BEARD, C.B. CARTER, J. CRANE, L. DUCHIN, J. BURMAN, W. RICHARDSON, J. & MESHNICK, S.R. (2001) *Pneumocystis carinii* cytochrome b mutations are associated with atovaquone exposure in patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (5), pp. 819-822.
- KAZANJIAN, P. LOCKE, A.B. HOSSLER, P.A. LANE, B.R. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. CANNON, M. & MESHNICK, S.R. (1998) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS*, 12 (8), pp. 873-878.

- KAZANJIAN, P.H. FISK, D. ARMSTRONG, W. SHULIN, Q. LIWEI, H. KE, Z. & MESHNICK, S. (2004) Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* Pneumonia, in the United States and China. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, pp. 1684-1687.
- KEELY, S.P. & STRINGER, J.R. (1997) Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (11), pp. 2745–2747
- KESSL, J.J. HILL, P. LANGE, B.B. MESHNICK, S.R. MEUNIER, B. & TRUMPOWER. B.L. (2004) Molecular basis for atovaquone resistance in *Pneumocystis jirovecii* modeled in the cytochrome bc1 complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, pp. 2817–2824.
- KIM, S. & MISRA, A. (2007) SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, pp. 289–320.
- KIMCHI-SARFATY, C. OH, J.M. KIM, I.W. SAUNA, Z.E. CALCAGNO, A.M. AMBUDKAR, S.V. GOTTESMAN, M.M. (2007) A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315 (5811), pp. 525-528.
- KOVACS, J.A. GILL, V.J. MESHNICK, S. & MASUR, H. (2001) New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *The Journal of The American Medical Association*, 286 (19), pp. 2450-2460.
- KWOK, P.Y. (2000) High-throughput genotyping assay approaches. *Pharmacogenomics*, 1 (1), pp. 1-5.
- KWOK, P.Y. (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2, pp. 235-258.
- LAMAIGNERE, C.G. ROILIDES, E. HACKER, J. & MULLER, F.M.C. (2003) Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (3), pp. 172–185.
- LANE, B.R. AST, J.C. HOSSLER, P.A. MINDELL, D.P. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. & MESHNICK, S.R. (1997) Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *The Journal of Infectious Diseases*, 175 (2), pp. 482-485.

- LATOUCHE, S. LACUBE, P. MAURY, E. BOLOGNINI, J. DEVELOUX, M. GIRARD, P.M. GODET, C. LEBRETTE, M.G. MAYAUD, C. GUILLOT, J. & ROUX, P. (2003) *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998-2001 prospective study. *Medical Mycology*, 41 (6), pp. 533-537.
- LATOUCHE, S. ORTONA, E. MAZARS, E. MARGUTTI, P. TAMBURRINI, E. SIRACUSANO, A. GUYOT, K. NIGOU, M. & ROUX, P. (1997) Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (2), pp. 383-387.
- LAUTENSCHLAGER, I. LYYTIKAINEN, O. JOKIPII, L. JOKIPII, A. MAICHE, A. RUUTU, T. TUKIAINEN, P. & RUUTU, P. (1996) Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (3), pp. 728-730.
- LE GAL, S. DAMIANI, C. PERROT, M. ROUILLÉ, A. VIRMAUX, M. QUINIO, D. MOALIC, E. SALIOU, P. BERTHOU, C. LE MEUR, Y. TOTET, A. & NEVEZ, G. (2012) Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74 (2), pp. 119-124.
- LEE, C.H. LU, J.J. BARTLETT, M.S. DURKIN, M.M. LIU, T.H. WANG, J. JIANG, B. & SMITH, J.W. (1993) Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (3), pp. 754-757.
- LU, J.J. & LEE, C.H. (2008) *Pneumocystis* pneumonia. *Journal of the Formosan Medical Association*, 107 (11), pp. 830-842.
- LU, J.J. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. & LEE, C.H. (1995) Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type-specific oligonucleotide probes derived from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (11), pp. 2973-2977.
- LUNDGREN, B. ELVIN, K. ROTHMAN, L.P. LJUNGSTROM, I. LIDMAN, C. & LUNDGREN, J.D. (1997) Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax*, 52 (5), pp. 422-424.

- MA, L. BORIO, L. MASUR, H. & KOVACS, J.A. (1999) *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *The Journal of Infectious Diseases*, 180 (6), pp. 1969-1978.
- MA, L. KOVACS, J.A. CARGNEL, A. VALERIO, A. FANTONI, G. & ATZORI, C. (2002) Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, pp. 1530-1532.
- MARKOULATOS, P. SIAFAKAS, N. & MONCANY, M. (2002) Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16 (1), pp. 47-51.
- MASKELL, N.A. WAINE, D.J. LINDLEY, A. PEPPERELL, J.C.T. WAKEFIELD, A.E. MILLER, R.F. & DAVIES, R.J.O. (2003) Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*, 58 (7), pp. 594-597.
- MATOS, O. & ESTEVES, F. (2010a) Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite*, 17 (3), pp. 219-232.
- MATOS, O. & ESTEVES, F. (2010b) *Pneumocystis jirovecii* multilocus gene sequencing findings and implications. *Future Microbiology*, 5 (8), pp. 1257-1267.
- MATOS, O. ÂNGELO, H. & ANTUNES, F. (2011) Protozoários oportunistas e *Pneumocystis jirovecii*. Em: ANTUNES, F. Manual sobre sida. 4ª Edição. Portugal: Permanyer Portugal, pp. 150-152.
- MATOS, O. AZEVEDO, P. CALDEIRA, L. MENDES, A.C. ARAÚJO, A.T. FORTE, M. & ANTUNES, F. (1995) Estudo comparativo de três métodos morfológicos para diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PPc) em infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH). *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 2, pp. 135-138.
- MATOS, O. COSTA, M.C. CORREIA, I. MONTEIRO, P. VIEIRA, J.R. SOARES, J. BONNET, M. ESTEVES, F. & ANTUNES, F. (2006) Infecção por *Pneumocystis*

*jiroveci* em imunocompetentes com patologia pulmonar, em Portugal. *Acta Medica Portuguesa*, 19, pp. 121-126.

MATOS, O. COSTA, M.C. LUNDGREN, B. CALDEIRA, L. AGUIAR, P. & ANTUNES, F. (2001) Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 20 (8), pp. 573-575.

MATOS, O. LUNDGREN, B. CALDEIRA, L. MANSINHO, K. AGUIAR, P. FORTE, M. & ANTUNES, F. (2000) Evaluation of two nested polymerase chain reactions for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 6 (3), pp. 149-152.

MEDRANO, F.J. MONTES-CANO, M. CONDE, M. HORRA, C. RESPALDIZA, N. GASCH, A. PEREZ-LOZANO, M.J. VARELA, J.M. & CALDERON, E.J. (2005) *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (2), pp. 245-250.

MENG, Z. ZAYKIN, D.V. XU, C.F. WAGNER, M. & EHM, M.G. (2004) Selection of genetic markers for association analyses, using linkage disequilibrium and haplotypes. *The American Journal of Human Genetics*, 73 (1), pp. 115-130.

MILLER, R. & HUANG, L. (2004) *Pneumocystis jirovecii* infection. *Thorax*, 59 (9), pp. 731-733.

MILLER, R.F. AMBROSE, H.E. NOVELLI, V. & WAKEFIELD, A.E. (2002) Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (4), pp. 1555-1557.

MILLER, R.F. LINDLEY, A.R. AMBROSE, H.E. ALIOUAT-DENIS, C.M. & WAKEFIELD, A.E. (2003) Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* from adult HIV-infected patients with *Pneumocystis* pneumonia. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50, pp. 654-655.

MILLER, R.F. LINDLEY, A.R. COPAS, A. AMBROSE, H.E. DAVIES, R.J.O. & WAKEFIELD, A.E. (2005b) Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. *Thorax*, 60 (8), pp. 679-682.

- MILLER, R.F. LINDLEY, A.R. MALIN, A.S. AMBROSE, H.E. & WAKEFIELD, A.E. (2005a) Isolates of *Pneumocystis jirovecii* from Harare show high genotypic similarity to isolates from London at the superoxide dismutase locus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99 (3), pp. 202-206.
- MONTES-CANO, M.A. CHABE, M. FONTILLON-ALBERDI, M. HORRA, C. RESPALDIZA, N. MEDRANO, F.J. VARELA, J.M. DEI-CAS, E. & CALDERON, E.J. (2009) Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerging Infectious Diseases*, 15 (1), pp. 125-127.
- MONTES-CANO, M.A. HORRA, C. MARTÍN-JUAN, J. VARELA, J.M. TORRONTERAS, R. RESPALDIZA, N. MEDRANO, F.J. & CALDERÓN, E.J. (2004) *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the spanish population. *Clinical Infectious Diseases*, 39 (1), pp. 123–128.
- MORRIS, A. (2008) Is there anything new in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia? Changes in *P. jirovecii* pneumonia over the course of the AIDS epidemic. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (4), pp. 634-636.
- MORRIS, A. BEARD, C.B. & HUANG, L. (2002) Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes and Infection*, 4(1), pp. 95-103.
- MORRIS, A. LUNDGREN, J.D. MASUR, H. WALZER, P.D. HANSON, D.L. FREDERICK, T. HUANG, L. BEARD, C.B. & KAPLAN, J.E. (2004) Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerging Infectious Diseases*, 10 (10), pp. 1713-1720.
- MORRIS, A. WEI, K. AFSHAR, K. & HUANGS, L. (2008) Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *The Journal of Infectious Diseases*, 197 (1), pp.10-17.
- MUNKSGAARD, B. (2004) *Pneumocystis jirovecii* (formerly *Pneumocystis carinii*). *American Journal of Transplantation*, 4 (10), pp. 135-141.
- NAHIMANA, A. BLANC, D.S. FRANCIOLI, P. BILLE, J. & HAUSER, P.M. (2000) Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by PCR-SSCP to indicate a high frequency of co-infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, pp. 753-758.

- NAHIMANA, A. RABODONIRINA, M. BILLE, J. FRANCIOLI, P. & HAUSER, P.M. (2004) Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure or prophylaxis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (11), pp. 4301-4305.
- NAHIMANA, A. RABODONIRINA, M. HELWEG-LARSEN, J. MENEAU, I. FRANCIOLI, P. BILLE, J. & HAUSER, P.M. (2003) Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (7), pp. 864-867.
- NOLLER, H.F. (1984) Structure of ribosomal RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 53, pp. 119-162.
- OLIVE, D.M. & BEAN, P. (1999) Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (6), pp. 1661-1669.
- OLSSON, M. ELVIN, K. LOFDAHL, S. & LINDER, E. (1993) Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (2), pp. 221-226.
- OLSSON, M. LIDMAN, C. LATOUCHE, S. BJORKMAN, A. ROUX, P. LINDER, E. & WAHLGREN, M. (1998) Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (6), pp. 1737-1740.
- PATEL, S. PEDRAZA-DÍAZ, S. MCLAUCHLIN, J. CASEMORE, D.P. OUTBREAK CONTROL TEAM SOUTH AND WEST DEVON 1995. INCIDENT MANAGEMENT TEAM & FURTHER EPIDEMIOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL STUDIES SUBGROUP NORTH THAMES 1997. (1998) Molecular characterisation of *Cryptosporidium parvum* from two large suspected waterborne outbreaks. *Communicable Disease and Public Health*, 1 (4), pp. 231-233.
- PENSANTI, E.L. (1984) *Pneumocystis carinii*: oxygen uptake, antioxidant enzymes, and susceptibility to oxygen-mediated damage. *Infection and Immunity*, 44 (1), pp. 7-11.

- PETERSON, J.C. & CUSHION, M.T. (2005) *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Current Opinion in Microbiology*, 8 (4), pp. 393-398.
- PODINI, D. & VALLONE, P.M. (2009) SNP genotyping using multiplex simple base primer extension assays. *Methods in Molecular Biology*, 578 (6), pp. 379-391.
- PONCE, C.A. GALLO, M. BUSTAMANTE, R. & VARGAS, S.L. (2010) *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical Infectious Diseases*, 50 (3), pp. 347-353.
- POWLES, M.A. MCFADDEN, D.C. PITTARELLI, L.A. & SCHMATZ, D.M. (1992) Mouse model for *Pneumocystis carinii* pneumonia that uses natural transmission to initiate infection. *Infection and Immunity*, 60 (4), pp. 1397-1400.
- REDHEAD, S.A. CUSHION, M.T. FRENKEL, J.K. & STRINGER, J.R. (2006) *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 (1), pp. 2-11.
- RIBES, J.A. LIMPER, A.H. ESPY, M.J. & SMITH, T.F. (1997) PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (4), pp. 830-835.
- RIPAMONTI, C. ORENSTEIN, A. KUTTY, G. HUANG, L. SCHUHEGGER, R. SING, A. FANTONI, G. ATZORI, C. VINTON, C. HUBER, C. CONVILLE, P. S. & KOVACS, J.A. (2009) Restriction fragment length polymorphism typing demonstrates substantial diversity among *Pneumocystis jirovecii* isolates. *The Journal of Infectious Diseases*, 200 (10), pp. 1616-1622.
- ROBBERTS, F.J.L. CHALKLEY, L.J. WEYER, K. GOUSSARD, P. & LIEBOWITZ, L.D. (2005) Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (3), pp.1443-1444.
- SANDUBETE, E.C. RODRÍGUEZ, Y.A. & PAZ, V.C. (2011). *Pneumocystis jirovecii*: one hundred years of history. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63 (2), pp. 97-116.
- SANTOS, L.D. LACUBE, P. LATOUCHE, S. KAC, G. MAYAUD, C. MARTEAU, M. POIROT, J.L. MAURY, E. GUILLOT, J. & ROUX, P. (1999) Contribution of

- dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* epidemiology. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46, pp. 133S-134S.
- SINCLAIR, K. WAKEFIELD, A.E. BANERJI, S. & HOPKIN, J.M. (1991) *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45 (1), pp. 183-184.
- SING, A. ROGGENKAMP, A. AUTENRIETH, I.B. & HEESEMANN, J. (1999) *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (10), pp. 3409-3410.
- SMITH, J.M. SMITH, N.H. O'ROURKE, M. & AND SPRATT, B.G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 4384-4388.
- SMULIAN, A.G. (2001) *Pneumocystis carinii*: genetic diversity and cell biology. *Fungal Genetics and Biology*, 34 (3), pp. 145-154.
- SOUZA, W. & BENCHIMOL, M. (2005) Basic biology of *Pneumocystis carinii* - a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (8), pp. 903-908.
- STRINGER, J.R. & WALZER, P.D. (1996) Molecular biology and epidemiology of *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *AIDS*, 10 (6), pp. 561-571.
- STRINGER, J.R. (1996) *Pneumocystis carinii*: What is it, exactly? *Clinical Microbiology Reviews*, 9 (4), pp. 489-498.
- STRINGER, J.R. (2002) *Pneumocystis*. *International Journal of Medical Microbiology*, 292 (5-6), pp. 391-404.
- STRINGER, J.R. BEARD, C.B. MILLER, R.F. & WAKEFIELD, A.E. (2002) A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), pp. 891-896.
- SYVANEN, A.C. (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 2, pp. 930-942.
- TAKAHASHI, T. ENDO, T. NAKAMURA, T. SAKASHITA, H. KIMURA, K. OHNISHI, K. KITAMURA, Y. & IWAMOTO, A. (2002a) Dihydrofolate reductase

gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 51 (6), pp. 510-515.

TAKAHASHI, T. KANDA, T. & IWAMOTO, A. (2002b) Genetic diversity of drug targets including dihydropteroate synthase, dihydrofolate reductase and cytochrome b, in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan. *Research Communication in Molecular Pathology and Pharmacology*, 112 (1-4), pp. 159-176.

TAMBURRINI, E. MENCARINI, P. DE LUCA, A. ANTINORI, A. VISCONTI, E. AMMASSARI, A. ORTONA, L. ORTONA, E. SIRACUSANO, A. & VICARI, G. (1993) Simple and rapid two-step polymerase chain reaction for diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (10), pp. 2788-2789.

TAMBURRINI, E. MERCARINI, P. VISCONTI, E. ZOLFO, M. DE, L.A. SIRACUSANO, A. ORTONA, E. & WAKEFIELD, A.E. (1996) Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, pp. 1586-1588.

THOMAS, C.F. & LIMPER, A.H. (2004) *Pneumocystis* pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 350 (24), pp. 2487-2498.

THOMAS, C.F. & LIMPER, A.H. (2007) Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nature Reviews Microbiology*, 5 (4), pp. 298-308.

TIBAYRENC, M. (2003) Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2 (12), pp. 1-6.

TIBAYRENC, M. KJELLBERG, F. & AYALA, F.J. (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, pp. 2414-2418.

TIBAYRENC, M. KJELLBERG, F. ARNAUD, J. OURY, B. BRENIERE, S.F. DARDE, M.L. & AYALA, F.J. (1991) Are eukaryotic microorganisms clonal or

- sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, pp. 5129-5133.
- TORRES, J. GOLDMAN, M. WHEAT, L.J. TANG, X. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. ALLEN, S.D. & LEE, C.H. (2000) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus–infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. *Clinical Infectious Diseases*, 30 (1), pp. 141-145.
- TSOLAKI, A.G. BECKERS, P. & WAKEFIELD, A.E. (1998) Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotypic similarity with contemporary isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (1), pp. 90–93.
- VALERIO, A. TRONCONI, E. MAZZA, F. FANTONI, G. ATZORI, C. TARTARONE, F. DUCA, P. CARGNEL, A. (2007) Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45 (5), pp. 521-528.
- VAN HAL, S.J. GILGADO, F. DOYLE, T. BARRATT, J. STARK, D. MEYER, W. & HARKNESS, J. (2009) Clinical significance and phylogenetic relationship of novel Australian *Pneumocystis jirovecii* genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 47 (6), pp. 1818-1823.
- VARELA, J.M. MEDRANO, F.J. DEI-CAS, E. & CALDERÓN, E.J. (2011) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in AIDS patients. Em: ZAJAC, V. *Microbes, Viruses and Parasites in AIDS Process*. Croatia: Intech, pp. 113-142.
- VARGAS, S.L. PONCE, C.A. GIGLIOTTI, F. ULLOA, A.V. PRIETO, S. MUÑOZ, M.P. & HUGHES, W.T. (2000) Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4), pp. 1536–1538.
- VARGAS, S.L. PONCE, C.A. SANCHEZ, C.A. ULLOA, A.V. BUSTAMANTE, R. & JUAREZ, G. (2003) Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (5), pp. 605-606.

- VISCONTI, E. ORTONA, E. MENCARINI, P. MARGUTTI, P. MARINACI, S. ZOLFO, M. SIRACUSANO, A. TAMBURRINI, E. (2001) Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, pp. 547-551.
- WAKEFIELD, A.E. (1996) DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (7), pp. 1754-1759.
- WAKEFIELD, A.E. (1998a) I. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 5-13.
- WAKEFIELD, A.E. (1998b) VI. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 22 (1-2), pp. 59–65.
- WAKEFIELD, A.E. (2002) *Pneumocystis carinii*. *British Medical Bulletin*, 61, pp. 175-188.
- WAKEFIELD, A.E. LINDLEY, A.R. AMBROSE, H.E. DENIS, C.M. & MILLER, R.F. (2003) Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus–infected patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 187, pp. 901-908.
- WAKEFIELD, A.E. PIXLEY, F.J. BANERJI, S. SINCLAIR, K. MILLER, R.F. MOXON, E.R. & HOPKIN, J.M. (1990) Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 43 (1), pp. 69-76.
- WALKER, D.J. WAKEFIELD, A.E. DOHN, M.N. MILLER, R.F. BAUGHMAN, R.P. HOSSLER, P.A. BARTLETT, M.S. SMITH, J.W. KAZANJIAN, P. & MESHNICK, S.R. (1998) Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *The Journal of Infectious Diseases*, 178 (6), pp. 1767–1775.
- WALZER, P.D. EVANS, H.E.R. COPAS, A.J. EDWARDS, S.G. GRANT, A.D. & MILLER, R.F. (2008) Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii*

pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clinical Infectious Diseases*, 46 (4), pp. 625-633.

WAZIR, J.F. & ANSARI, N.A. (2004) *Pneumocystis carinii* infection-update and review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 128 (9), pp. 1023-1027.

WISSMANN, G. MORILLA, R. FRIAZA, V. CALDERÓN, E. & VARELA, J.M. (2010) El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 (1), pp. 38-43.

---

***ANEXOS***

**ANEXO 1**

Nomenclatura IUPAC	Base
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
R	A ou G
Y	C ou T
S	G ou C
W	A ou T
K	G ou T
M	A ou C
B	C, G ou T
D	A, G ou T
H	A, C ou T
V	A, C ou G
N	A, C, G ou T