

Ana Tomás

2014

NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DA
PNEUMOCISTOSE





Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO
DA PNEUMOCISTOSE**

Ana Luísa Regatão Tomás

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

OUTUBRO, 2014



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

NOVAS ABORDAGENS NO DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DA PNEUMOCISTOSE

Ana Luísa Regatão Tomás

Orientador: Doutor Francisco Esteves

Coorientador: Investigador Fernando Cardoso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre no ramo das Ciências Biomédicas, realizada sob a orientação científica do Doutor Francisco Esteves e coorientação científica do Investigador Fernando Cardoso.

Outubro, 2014

Dedicatória

Dedicado à ciência.

“Fazei com que eu seja moderado em tudo, mas insaciável no meu amor pela ciência”
Maimónides (médico, séc. XII)

Dissertação escrita de acordo com o novo acordo ortográfico

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, pois foram eles que possibilitaram que eu completasse mais esta etapa da minha vida académica. Obrigada pelo apoio e amor constantes.

Ao meu orientador, Doutor Francisco Esteves, agradeço o empenho e esforço depositados neste projeto. Pela sua constante disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos e, particularmente, pelo incentivo e modo prático com que me ensinou a encarar as adversidades, o meu muito obrigado.

Ao Investigador Fernando Cardoso, como coorientador deste trabalho, agradeço a confiança em mim depositada e o apoio científico prestados. Terá sempre o meu reconhecimento pela disponibilidade inegável e pelo seu entusiasmo na coorientação deste trabalho.

À Professora Doutora Olga Matos, agradeço a possibilidade de realização deste projeto e a sua constante preocupação e disponibilidade para o sucesso do mesmo.

A todo o Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, da Universidade Nova de Lisboa, agradeço o acolhimento e a providência das condições necessárias à realização deste trabalho.

À minha colega e amiga, Sara Carapeta, agradeço o companheirismo, a força, o consolo e o encorajamento ao longo desta etapa. Parabéns, somos mestres!

Ao Doutor Vítor Rodrigues e à Doutora Luísa Martins, agradeço a compreensão pela minha necessidade de crescimento profissional.

Aos meus amigos e restantes familiares que se viram pontualmente privados da minha presença, para que me pudesse dedicar à concretização deste projeto, estendo o meu mais profundo agradecimento pelo incentivo constante.

Ao Eduardo, pelo apoio incondicional, por nunca me ter deixado desistir de correr atrás dos meus sonhos, pelo amor e carinho constantes, o meu muito obrigado.

Resumo

A pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) é uma importante infecção respiratória em doentes imunocomprometidos. O seu diagnóstico é baseado na visualização microscópica de quistos ou formas tróficas coradas e/ou na detecção de DNA de *Pneumocystis jirovecii* por PCR, em espécimes pulmonares normalmente obtidas por técnicas invasivas. O desenvolvimento de um teste serológico fiável e reprodutível é uma necessidade premente, pois permitirá o diagnóstico da PPc com recurso a amostras obtidas de forma minimamente invasiva, como o sangue.

Este estudo associou a síntese de um antígeno recombinante à técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) para detecção de anticorpos anti-*P. jirovecii*, procurando desenvolver uma nova abordagem laboratorial para o diagnóstico da PPc.

O antígeno recombinante sintético multiepítopo foi selecionado, desenhado e produzido com base no estudo da imunogenicidade do domínio carboxilo-terminal da glicoproteína *major* de superfície (MsgC) de *P. jirovecii*. O gene sintético codificante do antígeno recombinante foi clonado no vetor de expressão pLATE 31, através da tecnologia de clonagem independente de ligase. Este vetor permitiu a produção do antígeno recombinante sintético multiepítopo com uma cauda de poli-histidina terminal, o que possibilitou a sua purificação por cromatografia de alta afinidade com iões níquel imobilizados e a sua utilização como ferramenta antigénica numa técnica de ELISA. Esta técnica foi otimizada para a pesquisa de anticorpos totais e das imunoglobulinas IgG e IgM anti-*P. jirovecii*.

Foram estudados espécimes pulmonares e soros de 80 doentes imunocomprometidos, com suspeita de patologia pulmonar, e 17 soros de doadores de sangue (controlo). Os casos de PPc foram confirmados por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais e por *nested* PCR. A informação clínica do diagnóstico presuntivo da PPc (sintomas, PaO₂, exames radiológicos) estava disponível.

Estatisticamente, os níveis de IgM anti-*P. jirovecii* estavam aumentados nos doentes com PPc ($p = 0,003$), o que levou à rejeição da hipótese nula de que a distribuição deste marcador seja idêntica entre doentes com e sem PPc. O teste ELISA com pesquisa de anticorpos totais e IgG anti-*P. jirovecii* não apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p > 0,005$).

A análise da curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) do teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* mostrou que o *cut-off* que apresentou melhores resultados se situava numa absorvância (Abs) de 0,300 a 405 nm, com uma sensibilidade de 97 % e uma especificidade de 75 % ($p < 0,001$), quando associado ao diagnóstico clínico para a PPc.

Com esta abordagem inovadora, desenvolveu-se um novo método para detecção de *P. jirovecii*, sensível e específico quando associado ao diagnóstico clínico. Esta abordagem poderá funcionar como teste de rastreio da PPc, diminuindo a necessidade de se obter amostras por técnicas invasivas, o que será um grande benefício para o doente e uma melhoria no controlo clínico da doença.

Palavras-chave: *Pneumocystis jirovecii*; Pneumonia por *Pneumocystis* (PPc); Antígeno recombinante sintético multiepítopo; Glicoproteína *major* de superfície (Msg); ELISA.

Abstract

Pneumocystis jirovecii pneumonia (PcP) remains as a major life-threatening respiratory illness among immunocompromised patients. Diagnosis of PcP relies on microscopic visualization of *Pneumocystis jirovecii* stained cysts or trophic forms and/or DNA detection by PCR in respiratory specimens, normally obtained by invasive techniques. The development of a reliable and reproducible serological test is urgently needed, as it will allow the diagnosis of PcP using minimally invasive samples, such as blood.

This study aims to associate the production of a multi-epitope synthetic recombinant antigen and an ELISA method for detection of anti-Pj antibodies, in order to develop a new approach for the laboratory diagnosis of PcP.

The multi-epitope synthetic recombinant antigen was selected, designed and produced based on the study of the immunogenicity of the carboxyl-terminal domain of the major surface glycoprotein (MsgC) of *Pneumocystis jirovecii*. The synthetic gene coding for the recombinant antigen was cloned in the expression vector pLATE 31, through ligation independent cloning (LIC) technology. This vector enabled the synthetic production of the multi-epitope recombinant antigen with a polyhistidine tail end, allowing its purification by immobilized metal-ion affinity chromatography with nickel ions and its use as an antigenic tool in an ELISA technique. The ELISA was optimized for detection of total antibodies, IgG and IgM anti-*P. jirovecii*.

Lung specimens and sera from 80 immunocompromised patients with suspicion of pulmonary pathology, and 17 sera from blood donors (control), were studied. PPc cases were confirmed using indirect immunofluorescence with monoclonal antibodies and nested-PCR. Data on clinical diagnosis of PcP (symptoms, PaO₂, chest radiographs) were available.

The IgM anti-*P. jirovecii* levels were statistically increased in the PcP patients ($p = 0,003$), rejecting the null hypothesis that the distribution of this marker is the same for patients with and without PcP. The ELISA test for total antibodies and IgG anti-*P. jirovecii* results, showed no statistical significance ($p > 0,005$).

The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve of the ELISA IgM anti-*P. jirovecii* test demonstrated an optimal cut-off of 0,300 Abs at 405 nm, with 97 % sensitivity and 75 % specificity ($p < 0,001$), when associated with the clinical diagnosis criteria.

With this innovative approach, we developed an alternative method for detection of *P. jirovecii*, sensitive and specific when associated with the clinical diagnosis parameters. This new method may be used as a screening test for PcP, decreasing the need for samples obtained by invasive techniques, which is a major benefit to the patient's care and an improvement in the clinical management of the disease.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*; *Pneumocystis* pneumonia (PcP); Multi-epitope synthetic recombinant antigen; Major surface glycoprotein (Msg); ELISA.

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice	xiii
Índice de Figuras	xvii
Índice de Quadros.....	xix
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	xxi
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Perspetiva histórica e classificação taxonómica de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	2
1.2 Morfologia e Ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	4
1.2.1 Introdução ao ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	4
1.2.2 Morfologia de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	5
1.2.2.1 Trofozoíto ou forma trófica.....	5
1.2.2.2 Pré-quisto ou esporocisto	6
1.2.2.3 Quisto ou esporo	7
1.3 Epidemiologia da infeção por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	8
1.3.1 Transmissão de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	9
1.3.2 Latência <i>versus</i> reinfeção	10
1.4 Fisiopatologia da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	11
1.4.1 Interação parasita-hospedeiro	11
1.4.2 Resposta imunitária	12
1.4.2.1 Imunidade inata.....	12
1.4.2.2 A imunidade adaptativa	13
1.4.2.2.1 Imunidade adaptativa celular	13
1.4.2.2.2 Imunidade adaptativa humoral.....	14
1.5 Antígenos de Superfície de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	16
1.6 Diagnóstico da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	18
1.6.1 Diagnóstico presuntivo	18
1.6.2 Diagnóstico definitivo	19
1.6.2.1 Detecção microscópica de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	19
1.6.2.2 Detecção molecular de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	21
1.6.2.3 Outros métodos de diagnóstico da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	22

1.7 Prevenção e tratamento da pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i>	23
1.7.1 Profilaxia.....	23
1.7.2 Tratamento	24
1.8 Diagnóstico serológico da pneumocistose: produção de um antígeno recombinante sintético multiepítipo para imunodeteção de anticorpos anti- <i>Pneumocystis jirovecii</i>	25
1.8.1 Justificação.....	25
1.8.2 Objetivos	25
Capítulo 2 - Material e Métodos	27
2.1 Escolha e produção de um antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	29
2.1.1 Escolha do antígeno recombinante a sintetizar	29
2.1.2 Confirmação da presença da fração MsgC em DNA de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	29
2.1.3 Seleção das regiões de interesse e síntese do antígeno recombinante multiepítipo .	31
2.2 Clonagem do antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em <i>E. coli TOP10</i>	33
2.2.1 Obtenção de células competentes de <i>E. coli TOP10</i>	33
2.2.2 Transformação de <i>E. coli TOP10</i> competentes com o vetor pUC57-Amp	34
2.2.3 Confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas	35
2.2.4 Purificação e sequenciação de DNA amplificado nas células transformadas	37
2.2.5 Isolamento de DNA plasmídico de <i>E. coli TOP10</i> transformadas.....	37
2.3 Construção de um vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	37
2.3.1 Seleção do vetor de expressão a utilizar.....	37
2.3.2 Produção da sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão pLATE31	38
2.3.3 Construção do vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo em <i>E. coli TOP10</i> e <i>INVα</i>	40
2.3.4 Confirmação da transformação de <i>E. coli TOP10</i> e <i>INVα</i> com o vetor de expressão e isolamento de DNA plasmídico	41
2.4 Expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	42
2.4.1 Transformação de <i>E. coli BL21 Star (DE3)</i> competentes com o vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo	42
2.4.2 Indução da expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo	42
2.4.3 Estudo dos produtos da cultura celular quanto à presença de antígeno recombinante sintético multiepítipo após indução	44
2.4.3.1 Protocolo da técnica de ELISA utilizado na deteção do antígeno recombinante sintético multiepítipo nos diferentes produtos celulares	45

2.5	Purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	46
2.5.1	Escolha e preparação da resina para purificação por IMAC	46
2.5.2	Preparação da amostra para realização da purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo por IMAC	48
2.5.3	Procedimento de purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo por IMAC	49
2.6	Caracterização da amostragem	49
2.6.1	Processamento dos produtos biológicos	50
2.6.2	Deteção de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em espécimes pulmonares por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM)	50
2.6.3	Deteção de <i>Pneumocystis jirovecii</i> em espécimes pulmonares por PCR-nested	51
2.6.4	Processamento da informação clínica	51
2.7	Aplicação do antígeno recombinante sintético multiepítipo no desenvolvimento de um teste ELISA para deteção de anticorpos totais, IgG e IgM anti- <i>Pneumocystis jirovecii</i>	52
2.7.1	Protocolo do teste ELISA desenvolvido para avaliação da produção diferencial de anticorpos por parte dos diferentes grupos de indivíduos	53
2.8	Análise dos dados	54
Capítulo 3 - Resultados.....		55
3.1	Produção do antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	56
3.2	Clonagem do antígeno recombinante sintético multiepítipo em <i>E. coli TOP10</i>	59
3.3	Inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão	61
3.4	Expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo	65
3.5	Caracterização da amostragem para avaliação do antígeno recombinante sintético multiepítipo como biossensor da PPc	70
3.6	Aplicação do antígeno recombinante sintético multiepítipo no desenvolvimento de uma técnica de imunodeteção de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	72
Capítulo 4 - Discussão e Conclusões.....		81
4.1	Produção, expressão e purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	82
4.2	Aplicação do antígeno recombinante sintético multiepítipo no desenvolvimento de uma técnica de imunodeteção de anticorpos anti- <i>Pneumocystis jirovecii</i> por ELISA.....	92
Referências Bibliográficas		101

Anexos.....	115
Anexo 1	116
Anexo 2	117
Anexo 3	118
Anexo 4	120
Anexo 5	122
Anexo 6	123
Anexo 7	125
Anexo 8	127
Anexo 9	129
Anexo 10	131

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de <i>P. jirovecii</i> no alvéolo pulmonar do humano.....	4
Figura 2. Representação das principais estruturas da forma trófica de <i>P. jirovecii</i>	6
Figura 3. Ciclo de vida putativo da espécie <i>P. jirovecii</i> com esquematização dos estádios pré-quisticos	7
Figura 4. Imagem ilustrativa das principais estruturas da forma quística de <i>P. jirovecii</i>	8
Figura 5. Detecção de diferentes formas de <i>Pneumocystis</i> utilizando diferentes colorações.	21
Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada no presente estudo	28
Figura 7. Esquema das frações recombinantes Msg comparativamente à Msg total..	32
Figura 8. Esquema representativo do vetor de clonagem <i>pUC57-Amp</i> e dos seus constituintes genéticos	32
Figura 9. Representação da sequência amplificada pelos primers utilizados na reação de PCR que permite a amplificação da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo em <i>E. coli TOP10</i> transformadas com o vetor <i>pUC57-Amp</i>	36
Figura 10. Representação do vetor <i>pLATE 31</i> e da localização dos seus elementos genéticos constituintes.	38
Figura 11. Fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos da PCR <i>LongRange</i>	56
Figura 12. Resultado do alinhamento da sequenciação dos fragmentos obtidos na PCR <i>LongRange</i> com a sequência nucleotídica da região MsgC descrita na base de dados do NCBI	57
Figura 13. Esquema representativo da posição das três regiões selecionadas na sequência de aminoácidos da fração MsgC de <i>P. jirovecii</i> , segundo a escala de Kyle & Doolittle [a)] e dos seus perfis de hidrofobicidade individuais, segundo a mesma escala [b)].	58
Figura 14. Gráfico demonstrativo do número de UFC em função da duração do choque térmico a 42 °C.	60
Figura 15. Fotografia dos produtos de PCR correspondentes à amplificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo em colónias transformadas com o vetor <i>pUC57-Amp</i>	61
Figura 16. Fotografia dos produtos da PCR com os primers <i>pLATE31Fw</i> e <i>Rv</i> , de DNA plasmídico de colónias de <i>E. coli TOP10</i> transformadas com o vetor <i>pUC57-Amp</i>	62
Figura 17. Esquema ilustrativo da produção de extremidades complementares às do vetor de expressão no gene de interesse, por a ação da DNA T4 polimerase.	63
Figura 18. Gráfico representativo do número de UFC de <i>E. coli TOP10</i> e <i>INVα</i> transformadas com o vetor de expressão em função do volume de inóculo semeado em meio sólido LB com ampicilina.	64
Figura 19. Fotografia dos produtos de PCR de DNA plasmídico das colónias de <i>E. coli TOP10</i> e <i>INVα</i> transformadas com o vetor de expressão.....	65
Figura 20. Gel de eletroforese SDS-PAGE do lisado das colónias de <i>E. coli BL21 Star (DE3)</i> , após estimulação durante 3 horas a 37 °C com 1 mM IPTG, e respectivas colónias controlo.	66

Figura 21. Gel de eletroforese SDS-PAGE do lisado das colónias estudadas com seis condições de estimulação distintas.....	66
Figura 22. Gráfico representativo do valor médio de absorvância a 405 nm registado em cada produto da cultura celular analisado por técnica de ELISA.....	67
Figura 23. Gráfico representativo do valor médio de absorvância a 405 nm registado em cada lisado, em duplicado, em função do método e tampão de lise utilizados, analisado por técnica de ELISA.....	68
Figura 24. Gráfico representativo do valor das absorvâncias a 280 nm, registadas no aparelho <i>Nanodrop</i> , dos produtos obtidos sequencialmente, provenientes do procedimento de purificação aconselhado pelo fabricante.....	69
Figura 25. Gráfico representativo do valor das absorvâncias a 280 nm, registadas no aparelho <i>Nanodrop</i> , dos produtos obtidos sequencialmente, provenientes da otimização do procedimento de purificação aconselhado pelo fabricante.....	69
Figura 26. Fotografia do gel de eletroforese SDS-PAGE dos produtos provenientes da otimização do procedimento de purificação aconselhado pelo fabricante	70
Figura 27. Esquema ilustrativo dos passos da técnica de ELISA para deteção de anticorpos anti- <i>P. jirovecii</i> , numa amostra positiva para PPc e numa amostra negativa para PPc.....	72
Figura 28. Representação gráfica dos resultados do teste de ELISA das <i>pools</i> positiva e negativa, com períodos de incubação de 30 minutos a 37 °C [a)] e de 1 hora a 37 °C [b)] com os soros, com o conjugado e com o substrato.....	73
Figura 29. Representação gráfica dos resultados do teste de ELISA das <i>pools</i> positiva e negativa, com períodos de incubação de 30 minutos a 25 °C [a)] e de 1 hora a 25 °C [b)] com os soros, com o conjugado e com o substrato.....	74
Figura 30. Diagramas de extremos e quartis com representação da distribuição dos valores dos testes ELISA para pesquisa de anticorpos totais [a)], de IgG [b)] e de IgM [c)] anti- <i>P. jirovecii</i> , obtidos nas diferentes categorias de indivíduos estudados.....	75
Figura 31. Diagrama de extremos e quartis com representação da distribuição dos valores do teste ELISA para pesquisa de IgM anti- <i>P. jirovecii</i> , obtidos nas diferentes cargas parasitárias analisadas.	77
Figura 32. Curvas ROC para os diferentes testes ELISA efetuados neste estudo.....	77
Figura A1. <i>Vector pUC57</i>	118
Figura A2. <i>Cloning region</i>	118

Índice de Quadros

Quadro 1. Fármacos utilizados no tratamento da pneumocistose e suas respectivas ações	24
Quadro 2. Composição dos <i>primers</i> utilizados no presente estudo para a amplificação da fração MsgC.....	30
Quadro 3. Composição da mistura reacional utilizada na amplificação por PCR <i>LongRange</i>	30
Quadro 4. Condições térmicas aplicadas na PCR <i>LongRange</i> para amplificação específica da fração MsgC de <i>P. jirovecii</i>	31
Quadro 5. Composição dos <i>primers</i> que permitem a amplificação da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo presente no vetor clonado em <i>E. coli TOP10</i>	35
Quadro 6. Composição da mistura reacional da PCR para amplificação da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo.	35
Quadro 7. Condições térmicas aplicadas na PCR para amplificação específica da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo em <i>E. coli TOP10</i> , transformadas com o vetor <i>pUC57-Amp</i>	36
Quadro 8. Representação do local de restrição da enzima <i>EcoRV</i> numa sequência nucleotídica.	36
Quadro 9. Sequência dos <i>primers</i> desenvolvidos que permitem a produção de um amplicão correspondente à sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo, no vetor de expressão <i>pLATE 31</i>	39
Quadro 10. Composição da mistura reacional utilizada na PCR para produção da sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão <i>pLATE 31</i>	Erro! Marcador não definido.
Quadro 11. Condições térmicas aplicadas na PCR para produção da sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão <i>pLATE 31</i>	39
Quadro 12. Composição da mistura reacional para síntese das extremidades complementares ao vetor de expressão, no fragmento de PCR purificado, correspondente à sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo a clonar.....	40
Quadro 13. Diferentes condições de estimulação utilizadas na otimização do processo de indução da expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo em <i>E. coli BL21 Star (DE3)</i> transformadas com o vetor de expressão.	44
Quadro 14. Composição química e função dos diferentes tampões a utilizar no processo de purificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo por IMAC com o <i>kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow</i>	47
Quadro 15. Critérios de semi-quantificação da carga parasitária das amostras de secreções pulmonares analisadas pela técnica de IFI/AcM.....	51
Quadro 16. Composição em aminoácidos do antígeno recombinante sintético multiepítipo.	59
Quadro 17. Discriminação de parâmetros físico-químicos do antígeno recombinante multiepítipo sintetizado.....	59
Quadro 18. Sequência nucleotídica das bandas excisadas do gel de agarose, correspondentes aos produtos de amplificação da reação de PCR do vetor <i>pUC57-Amp</i> puro e da colônia de <i>E. coli TOP10</i> transformada.	61

Quadro 19. Resultado da sequenciação das bandas com tamanho correspondente à amplificação do antigénio recombinante sintético multiepítopo com extremidades complementares às do vetor..	62
Quadro 20. Parâmetros clínicos, imunológicos e laboratoriais dos 80 indivíduos com suspeita de PPc, em estudo.	71
Quadro 21. Valores das áreas abaixo da curva ROC para os três testes ELISA e valores de <i>p</i> , para um nível de significância de 5 %, a elas associados.	78
Quadro 22. Medidas estatísticas calculadas para os diferentes <i>cut-offs</i> estudados.	79
Quadro 23. Medidas estatísticas da associação dos resultados do teste ELISA com pesquisa de IgM anti- <i>P. jirovecii</i> com o diagnóstico clínico para PPc.	79
Quadro A1. Elementos genéticos constituintes do vetor <i>pLATE 31</i> e suas funções	122
Quadro A2. Composição da mistura do gel de resolução	123
Quadro A3. Composição da mistura do gel de concentração	123
Quadro A4. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação do gene <i>mtLSUrRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> por PCR- <i>nested</i> e respetivas dimensões dos fragmentos de amplificação que originam	131
Quadro A5. Condições térmicas aplicadas na PCR- <i>nested</i> para amplificação específica do gene <i>mtLSUrRNA</i> de <i>P. jirovecii</i> .	132

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

% – Percentagem

% (m/v) – Percentagem massa/volume

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de amónia

°C – Graus *Celsius*

µL – Microlitro

µM – Micromolar

A, C, G, T – Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina e timina)

Abs – Absorvância

AUC – Área abaixo da curva ROC (do inglês, *Area Under the ROC Curve*)

bla – Gene da β-lactamase

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

CDC – Centro de controlo e prevenção de doenças dos Estados Unidos da América (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)

cm – Centímetro

dATP – Desoxirribonucleótido de adenosina trifosfato (do inglês, *deoxyadenosine triphosphate*)

dCTP – Desoxirribonucleótido de citosina trifosfato (do inglês, *deoxycytidine triphosphate*)

dGTP – Desoxirribonucleótido de guanina trifosfato (do inglês, *deoxyguanosine triphosphate*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados (do inglês, *Deoxyribonucleotide triphosphate*)

DTT – Ditioneitol

dTTP – Desoxirribonucleótido de timina trifosfato (do inglês, *Thymidine triphosphate*)

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EI – Expetoração induzida

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fw – *Forward*

g – Força gravítica

H₂O – Água

HCl – Ácido clorídrico

IFI – Imunofluorescência indireta

IFI/AcM – Imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

IgM – Imunoglobulina M

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IL-6 – Interleucina 6

IMAC – Cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados (do inglês, *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*)

INF- γ – Interferão gama

IPTG – do inglês *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

Kb – Quilobases

KCl – Cloreto de potássio

kDa – QuiloDalton

KEX1 – do inglês *Kexin-like serine protease 1*

KH₂PO₄ – Dihidrogenofosfato monopotássico

KL-6 – do inglês *Krebs von den Lugen-6*

lacZ – Operação lac

LB – Meio de cultura *Luria-Bertani*

LBA – Lavado broncoalveolar

LDH – Lactato desidrogenase (do inglês, *Lactate dehydrogenase*)

LIC – Clonagem independente de ligase (do inglês, *Ligase Independent Cloning*)

LO – Lavado oral

LPS – Lipopolissacarídeos (do inglês, *Lipopolysaccharide*)

M – Molar (mole/L)

MA – Macrófagos alveolares

MCS – Local de inserção da sequência a clonar (do inglês, *Multiple Cloning Site*)

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mmHg – Milímetro de mercúrio

Msg – Glicoproteína *major* de superfície (do inglês, *Major surface glycoprotein*)

MSR – Glicoproteína relacionada com a glicoproteína *major* de superfície (do inglês, *Major Surface glycoprotein Related*)

mtLSUrRNA – Subunidade grande do RNA ribossômico mitocondrial (do inglês, *Mitochondrial Large Subunit ribosomal RNA*)

Na₂HPO₄ – Hidrogenofosfato dissódico

NaCl – Cloreto de Sódio

NCBI – do inglês *Nacional Center for Biotechnology Information*

Ni²⁺ – Ião níquel

p – Valor da estatística de teste

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio arterial

pb – Par de bases

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PBS-T – Tampão fosfato salino suplementado com detergente *Tween*

PBS-T+BSA – Tampão fosfato salino suplementado com detergente *Tween* e albumina sérica bovina

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)

pH – Potencial de hidrogênio

pI – Ponto isoelétrico

pmol – Picomole

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (do inglês, *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PPc – Pneumonia por *Pneumocystis*

PRR – Recetores de reconhecimento de padrões (do inglês, *Recognition Pattern Receptors*)

PVA – Álcool polivinílico (do inglês, *Polyvinyl Alcohol*)

rep (pMB1) – Origem de replicação do plasmídeo pMB1

ROC – Característica de Operação do Recetor (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*)

rpm – Rotações por minuto

rRNA – RNA ribossômico (do inglês, *ribosomal ribonucleic acid*)

RT-qPCR – PCR quantitativo em tempo real (do inglês, *Real-time quantitative PCR*)

Rv – *Reverse*

SAM – S-adenosilmetionina

SDS – Dodecil-sulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl sulfato*)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (do inglês, *Sodium dodecyl sulfato polyacrylamide gel electrophoresis*)

sida – Síndrome da imunodeficiência humana adquirida

SOC – Meio otimizado com repressão catabólica (do inglês, *Super-optimal broth with catabolite repression*)

SPSS – Programa informático de análise estatística (do inglês, *statistical package for social sciences*)

T CD4⁺ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 4 (do inglês, *cluster of differentiation 4*).

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

T CD8⁺ – Linfócitos T com recetores do agrupamento de diferenciação 8 (do inglês, *cluster of differentiation 8*).

TARV – Terapia anti retrovírica

TES – Tampão salino de Tris EDTA (do inglês, *Tris EDTA Buffer Saline*)

TMP – Trimetoprim

TMP-SMZ – Trimetoprim-Sulfametoxazol

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumor necrosis factor alfa*)

Tris – Tris(hidroximetilo)aminometano

Tris-HCl – Tris(hidroximetilo)aminometano-ácido clorídrico

U – Unidades

UFC – Unidade formadora de colónia

UNL – Universidade Nova de Lisboa

V – *Volts*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

χ^2 – Teste do Chi-quadrado

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Perspetiva histórica e classificação taxonómica de *Pneumocystis jirovecii*

Pneumocystis foi primeiramente descoberto por Carlos Chagas em 1909, quando ao realizar exames de microscopia, observou a presença de formas quísticas multinucleares em cortes histológicos do pulmão de animais doentes com uma patologia de etiologia ainda indefinida, que mais tarde viria a ser designada por doença de Chagas. Como tinha sido recentemente feita a descoberta e descrição das formas esquizontes do parasita da malária, tal facto encaminhou Chagas a considerar estas formas quísticas como esquizontes tecidulares pertencentes ao ciclo de vida do novo parasita (*Trypanossoma cruzi*), na altura denominado *Schizotrypanum cruzi* (Calderón-Sandubete *et al.*, 2002; de Souza & Benchimol, 2005).

Em 1914, no Instituto *Pasteur* em Paris, o casal Delanoe, ao examinar ratos colhidos em Paris que não estavam infetados com *Trypanossoma*, descreveu a observação das mesmas formas quísticas, considerando-as representativas de uma nova espécie de protozoário. O casal atribuiu-lhe a designação de *Pneumocystis carinii* pelo tropismo que a espécie apresentava para os pulmões (“*Pneumo*”), pela sua forma quística típica (“*cystis*”) e como homenagem ao biólogo italiano António Carini (“*carinii*”) que, em 1910, lhes havia enviado amostras do mesmo microrganismo, isoladas de pulmões de ratos provenientes do Brasil e infetados simultaneamente com *Trypanossoma lewisi* (Calderón-Sandubete *et al.*, 2002; de Souza & Benchimol, 2005).

No início do século XX, este agente patogénico era considerado um parasita pulmonar enigmático. No entanto, com o aparecimento de um alto número de casos de pneumonia por *Pneumocystis* (PPc) em crianças prematuras e mal nutridas na Europa Central e Ocidental durante e após a II Guerra Mundial e, mais tarde, com a epidemia da sida nos anos 80 do século passado, com alta prevalência de casos de PPc em indivíduos seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH), este microrganismo tornou-se um dos mais importantes agentes oportunistas em doentes imunodeprimidos e, conseqüentemente, um importante problema de saúde pública a nível mundial (Calderón-Sandubete *et al.*, 2002; de Souza & Benchimol, 2005).

A classificação taxonómica deste microrganismo foi envolta, desde cedo, em grande controvérsia, pelo que a sua classificação actual levou décadas a ser formulada (Stringer, 1996; Calderón-Sandubete *et al.*, 2002; Aliouat-Denis *et al.*, 2008). Diversos estudos moleculares apontam para uma elevada semelhança genética entre

Pneumocystis e outros organismos do reino *Fungi* (Edman *et al.*, 1989a; Edman *et al.*, 1989b; Ypma-Wong, Fonzi & Sypherd *et al.*, 1992). Contudo, parece tratar-se de um fungo atípico quando comparado com outros fungos patogénicos que afetam o Homem. *Pneumocystis* não responde à anfotericina B (antifúngico de largo espectro), devido à presença de colesterol em vez de ergosterol na sua parede celular. Porém, quando se utilizam fármacos ativos contra protozoários, o tratamento da PPC decorre com sucesso (Hughes *et al.*, 1974, Sattler *et al.*, 1988; Stringer, 1996). *Pneumocystis* apresenta etapas do ciclo de vida (forma trófica, forma quística, corpos intraquísticos) que não são apropriadas para descrever o ciclo de vida de um fungo típico unicelular (Stringer, 1996) e a nível filogenético, o seu ácido ribonucleico ribossómico (rRNA, do inglês *ribosomal ribonucleic acid*) é codificado por apenas um gene nuclear, ao contrário de outros fungos estudados, que possuem centenas de cópias para este gene (Tang *et al.*, 1998).

Técnicas moleculares revelaram a presença de microrganismos do género *Pneumocystis* numa grande variedade de espécies animais, o que é indicativo da existência de espécies específicas de hospedeiro (de Souza & Benchimol, 2005). Em 1999, a comunidade científica mudou a designação da espécie isolada em humanos para *P. jirovecii* em homenagem a Otto Jirovec, que identificou, pela primeira vez, diferenças estruturais entre as espécies que infetam os humanos e as que infetam outros animais (Stringer *et al.*, 2002; Redhead *et al.*, 2006).

Atualmente, a classificação taxonómica de *P. jirovecii* (Redhead *et al.*, 2006) é a seguinte:

Reino - Fungi

Sub-reino - Dikarya

Filo - Ascomycota

Sub-Filo - Taphrinomycotina *sensu*

Classe - Pneumocystidomycetes

Ordem - Pneumocystidales

Família - Pneumocystidaceae

Género - *Pneumocystis*

Espécie - *P. jirovecii* (humano)

1.2 Morfologia e Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii*

1.2.1 Introdução ao ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii*

O estudo do ciclo de vida de *Pneumocystis* tem sido um desafio duradouro, muito devido à incapacidade de cultivo deste microrganismo *in vitro* por longos períodos de tempo e de forma reprodutível (de Souza & Benchimol, 2005). No entanto, estudos ultra estruturais de microscopia eletrônica de transmissão, baseados na observação de tecidos pulmonares de ratos e humanos infetados, têm permitido avanços no conhecimento sobre o ciclo de vida de *Pneumocystis* (Vavra & Kucena, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Hasleton, Curry & Rankin, 1981; Dei-Cas, 2000; Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2011). Nestes estudos, foi estabelecida a existência de, pelo menos, duas formas diferentes ao longo do ciclo de vida do microrganismo: a forma trófica (ou trofozoíto) haploide e com reprodução assexuada, e a forma quística (ou esporo) diploide e com reprodução sexuada. Porém, formas intermédias como o pré-quisto (ou esporocisto) são também observadas (Vavra & Kucena, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Hasleton, Curry & Rankin, 1981; Dei-Cas, 2000; de Souza & Benchimol, 2005; Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2011). Um esquema representativo do ciclo de vida de *P. jirovecii* está presente na figura 1.

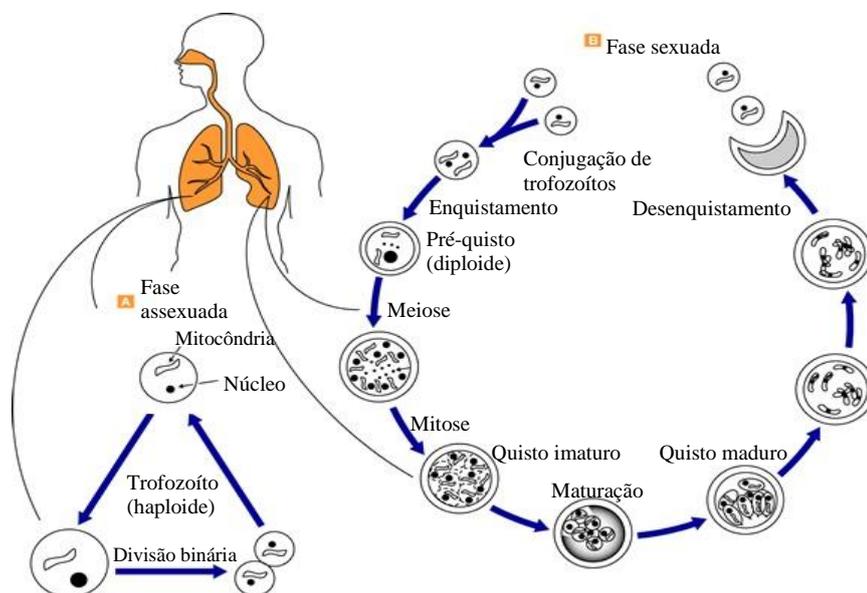


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *P. jirovecii* no alvéolo pulmonar do humano. O ciclo de vida deste microrganismo inclui duas fases: a fase de reprodução assexuada (A) e a fase de reprodução sexuada (B) (imagem adaptada do CDC, 2014).

Os trofozoítos são células haploides, que se multiplicam por fissão binária dando lugar à fase de reprodução assexuada. Contudo, estas células podem sofrer conjugação formando uma célula diploide (pré-quisto) dando lugar à fase de reprodução sexuada. Nesta fase, ocorre uma meiose, seguida de mitose com a formação do quisto, com oito núcleos que adquirem delimitação citoplasmática, dando origem a oito corpos intraquísticos. Com a maturação do quisto, os oito corpos intraquísticos são libertados no espaço alveolar e transformados em novos trofozoítos (de Souza & Benchimol, 2005).

1.2.2 Morfologia de *Pneumocystis jirovecii*

1.2.2.1 Trofozoíto ou forma trófica

Nos indivíduos infetados, os trofozoítos encontram-se disseminados pelos alvéolos pulmonares e representam a forma vegetativa do microrganismo, sendo facilmente identificados no pulmão devido à sua forma irregular e estreita associação com os pneumócitos do tipo I (de Souza & Benchimol, 2005). Trata-se de uma célula polimórfica cujo citoplasma é pobre em organelos e o núcleo é visível em posições variáveis, com a presença de um nucléolo, de pequenas dimensões, localizado no centro ou periferia do mesmo (de Souza & Benchimol, 2005).

Os trofozoítos possuem uma membrana celular fina, com 20-50 nm de espessura, que apresenta duas camadas: uma interna uniforme com cerca de 35 nm de espessura e uma camada externa mais fina (15 nm), rica em antigénios de superfície e com prováveis funções na regulação osmótica e no transporte de macromoléculas. Alguns autores consideram que estas células têm características ameboides, com a presença de projeções citoplasmáticas semelhantes a filopódias que podem ser importantes na fixação, nutrição e locomoção do organismo (Ruffolo, Cushion & Walzer, 1989; Hasleton, Curry & Rankin, 1981; Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

A representação estrutural da forma trófica está presente na figura 2.

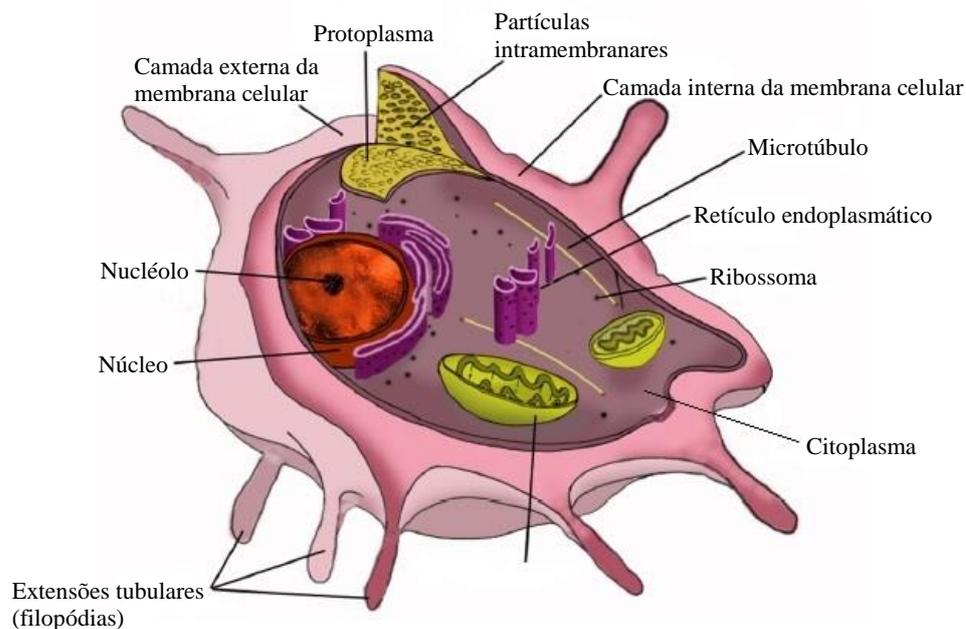


Figura 2. Imagem representativa das principais estruturas da forma trófica de *P. jirovecii* (adaptado de Souza & Benchimol, 2005)

1.2.2.2 Pré-quistos ou esporocistos

Dois trofozoítos haploides conjugam-se, dando origem a uma célula diploide que se divide por fissão binária ou endogenia. Em alternativa, esta célula pode iniciar um processo de esporogénese com divisão meiótica seguida de divisão mitótica, conduzindo à formação de uma grande célula esférica com oito núcleos (de Souza & Benchimol, 2005). Desconhece-se quais os fatores que conduzem a este fenómeno de esporogénese ou enquistamento. No entanto, uma teoria datada de 1981 propõe que o estímulo poderá ocorrer quando o alvéolo está preenchido de trofozoítos, dificultando a aderência de novos parasitas (Hasleton, Curry & Rankin, 1981). Evidências importantes para a ocorrência de meiose e reprodução sexuada no ciclo de vida de *Pneumocystis*, são a presença de microtúbulos e complexos sinaptonémicos que permitem o alinhamento dos cromossomas homólogos (Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

Esta transição das formas tróficas haploides para formas maduras quísticas com oito esporos no seu interior, parece ocorrer através da passagem por três estádios intermédios consecutivos de pré-quistos (ver figura 3), tratando-se de uma etapa de desenvolvimento deste microrganismo resultante de uma fase de reprodução sexuada (Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

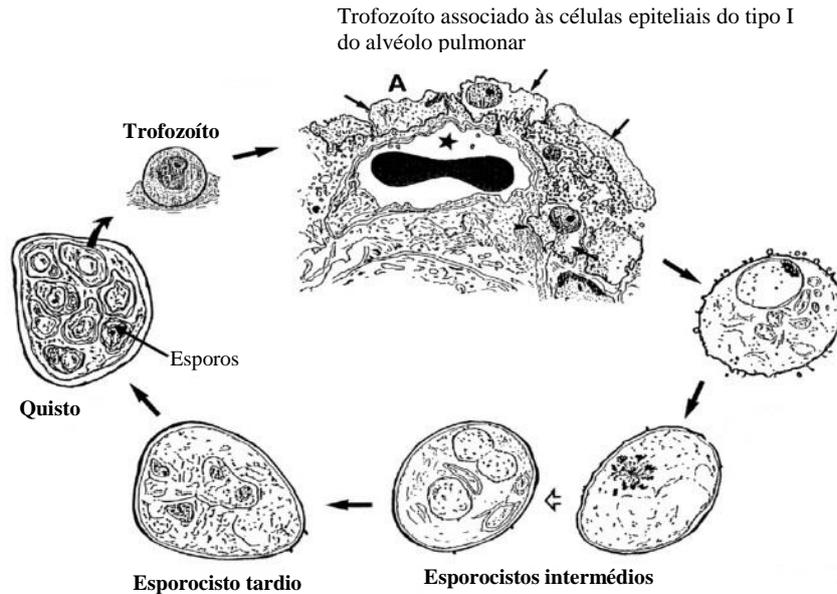


Figura 3. Ciclo de vida putativo da espécie *P. jirovecii* com esquematização dos estádios pré-quísticos (adaptado de Aliouat-Denis et al., 2008).

1.2.2.3 Quisto ou esporo

Os quistos são facilmente identificáveis devido à sua morfologia típica. São estruturas esféricas com poucas filopódias à superfície e com um diâmetro médio de 5-8 μm , contendo até oito corpos intraquísticos delimitados, com diâmetros médios de 1-2 μm . A parede do quisto ou esporo tem duas camadas e possui cerca de 120-160 nm de espessura. A camada exterior mais fina é mais densa, enquanto a camada interior tem um forte espessamento, formando uma película protetora em contacto com a membrana plasmática do quisto. Esta parede forma uma espécie de fenda, que se pensa poder estar, de alguma forma, relacionada com o fenómeno de desenquistamento, pois nesta zona localiza-se uma estrutura semelhante a um orifício (Ruffolo, Cushion & Walzer, 1989; de Souza & Benchimol, 2005).

A porção interna do quisto contém dois componentes: uma matriz e os corpos intraquísticos (de Souza & Benchimol, 2005). A matriz contém mitocôndrias, ribossomas, vacúolos vazios e restos de membrana. Os corpos intraquísticos são estruturas de forma esférica a oval (1 μm), com um núcleo localizado centralmente. A representação estrutural da forma quística está presente na figura 4.

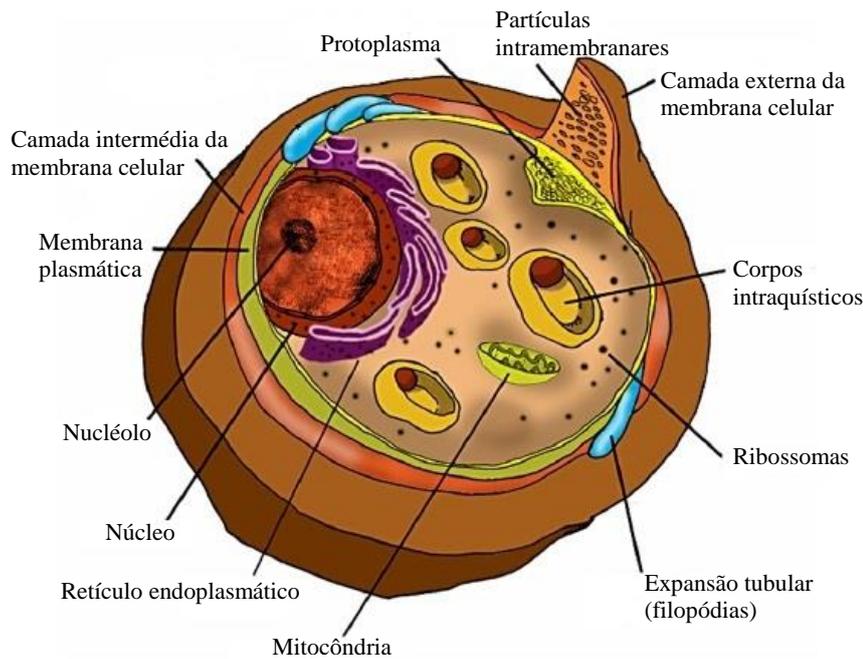


Figura 4. Imagem ilustrativa das principais estruturas da forma quística de *P. jirovecii* (adaptado de Souza & Benchimol, 2005).

1.3 Epidemiologia da infecção por *Pneumocystis jirovecii*

A pneumonia por *Pneumocystis* (PPc), ou pneumocistose, é o nome pelo qual se designou a pneumonia causada por *P. jirovecii*. O termo PPc deriva do facto de *P. jirovecii* anteriormente ser designado por *Pneumocystis carinii* e de este termo já ter uso corrente, razão pela qual se racionalizou a sua utilização, passando a significar **Pneumonia por *Pneumocystis*** (Morris *et al.*, 2004).

P. jirovecii é frequentemente encontrado nos pulmões de pessoas saudáveis, no entanto, a PPc é rara em indivíduos com sistema imunitário intacto, pelo que antes da epidemia VIH/sida, a pneumocistose era uma doença pouco comum. Assim, foi nos anos 80 que se verificaram alterações significativas na incidência de pneumocistose, passando esta infecção de rara para uma pneumonia comum (Morris *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011; Miller, Huang & Walzer, 2013). Contudo, no final dos anos 80 e início dos anos 90 do século passado, houve uma diminuição dos casos de PPc nos EUA e na Europa Ocidental, devido à implementação generalizada da quimioprofilaxia anti-*P. jirovecii* e da implementação da terapêutica anti retrovírica (TARV) para o VIH (Miller, Huang & Walzer, 2013).

Antes do aparecimento das formas mais efetivas de tratamento, a PPc era uma causa de morte comum e rápida nos doentes com sida. Atualmente, apesar da diminuição do número de casos mortais e de infeção pelo VIH nos EUA e na Europa Ocidental, a PPc continua a ser uma doença de grande relevância. A PPc permanece como uma causa significativa de morbilidade e mortalidade na era da TARV, sendo, nos continentes industrializados como a América do Norte e Europa, considerada ainda a infeção oportunista mais comum nos doentes com sida. Ocorre predominantemente em doentes que não recebem ou não recorrem a cuidados médicos, e também naqueles que, apesar do acesso aos cuidados médicos, não cumprem os programas de prevenção da doença (Morris *et al.*, 2004; Esteves *et al.*, 2014b). Nas regiões de baixo/médio rendimento, pensava-se que a prevalência de PPc seria muito menor, mas estudos recentes têm demonstrado que o reduzido número de casos reportados se deve, na verdade, a deficiências no diagnóstico da doença, uma vez que este requer recursos de diagnóstico a que esses países não têm acesso (Miller, Huang & Walzer, 2013).

Atualmente, a pneumocistose continua a ser uma infeção oportunista importante na população imunocomprometida, quer nos indivíduos seropositivos quer nos seronegativos para VIH. O aumento do uso de agentes imunossupressores por longos períodos de tempo ou em doses elevadas, tem resultado no aumento do número de casos de PPc em indivíduos não seropositivos para VIH, sendo que dentro desse grupo de indivíduos, os principais doentes de risco para o desenvolvimento da doença são os doentes oncológicos submetidos a quimioterapia e/ou radioterapia, os recetores de órgãos transplantados sujeitos a imunossupressão e os indivíduos com doenças autoimunes a receberem terapia imunossupressiva (Sowden & Carmichael, 2004; de Castro *et al.*, 2007).

1.3.1 Transmissão de *Pneumocystis jirovecii*

Ainda não está claramente definida qual a principal forma infetante responsável pela infeção, nem qual a via de transmissão de *P. jirovecii*. No entanto, a teoria mais aceite é que os organismos infecciosos são transmitidos de um hospedeiro para outro por via aérea (Carmona & Limper, 2011). As observações que apoiam esta teoria baseiam-se no facto de não ser raro detetar a presença de *Pneumocystis* em animais e humanos saudáveis (Dumoulin *et al.*, 2000; Demanche *et al.*, 2005), o que implica que

um hospedeiro saudável normal pode servir de reservatório para a infecção, assim como uma fonte de propagação da mesma. Por outro lado, estudos moleculares permitiram detectar a presença de DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*) de *P. jirovecii* em amostras de ar recolhidas em quartos e enfermarias onde se encontravam internados doentes com PPc (Singer *et al.*, 1975; Olsson *et al.*, 1996), sugerindo a via aérea como um potencial mecanismo de transmissão do microrganismo. A transmissão vertical de *P. jirovecii*, apesar de controversa, foi sugerida para os humanos por alguns autores (Mortier *et al.*, 1995; Rivero *et al.*, 2008).

Quando a forma infecciosa de *P. jirovecii* é inalada e atinge os pulmões, as formas tróficas têm capacidade de se fixar, especificamente, às células epiteliais do tipo I do alvéolo pulmonar (pneumócitos do tipo I), onde se desenvolvem progressivamente, preenchendo as cavidades alveolares (Dei-Cas, 2000). *Pneumocystis* apresenta tropismo para o pulmão e raramente se dissemina para outros órgãos, embora já tenham sido relatados casos ocasionais de infecção extrapulmonar, especificamente em doentes com infecção avançada por VIH (Dieterich *et al.*, 1992; Guttler *et al.*, 1993; Bartlett & Hulette, 1997; Ruggli *et al.*, 1997).

Por outro lado, a infecção por *Pneumocystis* apresenta especificidade entre a espécie do parasita e o respetivo hospedeiro, pelo que o microrganismo que infeta os humanos é diferentes de outros que infetam outros mamíferos. Assim, exclui-se que a infecção por *P. jirovecii* possa ser adquirida a partir de um reservatório animal, ocorrendo apenas transmissão entre humanos. Porém, a existência de reservatórios ambientais de *P. jirovecii* não está colocada de parte, aceitando-se que este microrganismo se encontre distribuído pelo ambiente (Dei-Cas, 2000).

1.3.2 Latência versus reinfeção

Devido à elevada seroprevalência de anticorpos anti-*P. jirovecii* em crianças (Pifer *et al.*, 1978) presumia-se que os organismos latentes eram adquiridos pelos hospedeiros ainda na primeira infância. Assim, pensava-se que, uma vez adquirido, o microrganismo se mantinha no pulmão do hospedeiro imunocompetente sem causar sintomatologia, pois o sistema imunitário era capaz de controlar com sucesso a infecção, apesar de não ser capaz de eliminar o microrganismo. Porém, em situação de imunossupressão, a infecção latente era reativada e a doença era expressa

(Sing *et al.*, 1999; Chabe *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2006). No entanto, estudos suportam a ideia de que *P. jirovecii* pode ser adquirido *de novo*, contrariando a infecção latente como principal mecanismo de infecção. Alguns estudos genéticos revelam que não foi possível detetar *P. jirovecii* em imunocompetentes saudáveis (Vargas *et al.*, 1995; Oz & Hughes, 2000), enquanto outros demonstram que os padrões de distribuição das frequências alélicas de isolados de *P. jirovecii* estão mais fortemente associados com o local onde é feito o diagnóstico, do que com o local de nascimento dos hospedeiros (Dohn *et al.*, 2000; Beard *et al.*, 2000).

1.4 Fisiopatologia da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

1.4.1 Interação parasita-hospedeiro

Dada a afinidade deste microrganismo para parasitar os pneumócitos do tipo I dos alvéolos pulmonares humanos, as manifestações pulmonares são as mais frequentes e comuns numa infecção causada por este agente. Após estabelecer a infecção no pulmão de um doente imunocomprometido, *P. jirovecii* destrói as células do hospedeiro promovendo um processo inflamatório que conduz à hipoxemia e possivelmente a uma insuficiência respiratória capaz de originar a morte do hospedeiro (Yoneda & Walzer, 1983; Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

Os sintomas da pneumocistose são geralmente febre (38 °C a 40 °C), dispneia e tosse, regra geral, não produtiva ou produzindo pequenas quantidade de expectoração (Barry & Johnson, 2001). No entanto, os sintomas diferem muito de doente para doente, pelo que, o diagnóstico clínico deve sempre considerar também o historial clínico do doente. Nos seropositivos para VIH, o início da doença é geralmente subtil e caracteriza-se por semanas de sintomas vagos como emagrecimento, queixas pulmonares e astenia, enquanto nos imunocomprometidos seronegativos para VIH, os sintomas surgem de forma mais aguda, podendo progredir rapidamente para a insuficiência respiratória (Calderón *et al.*, 2010).

Além da infecção pulmonar característica, a presença de *P. jirovecii* tem vindo a ser descrita noutros órgãos e tecidos, em doentes imunocomprometidos (Dieterich *et al.*, 1992; Guttler *et al.*, 1993; Bartlett & Hulette, 1997; Ruggli *et al.*, 1997). Estas manifestações são raras e normalmente concomitantes com localização pulmonar do microrganismo, o que sugere disseminação sistémica a partir do pulmão

em doentes que apresentam um estado de imunossupressão muito grave, sem profilaxia ou com profilaxia com pentamidina.

1.4.2 Resposta imunitária

1.4.2.1 Imunidade inata

No combate à pneumocistose, existem quatro linhas de defesa inata a ter em conta: os macrófagos alveolares, as células dendríticas, os neutrófilos e as células epiteliais pulmonares (Kelly & Shellito, 2010).

Pneumocystis tem tropismo para os espaços alveolares do pulmão, sendo os macrófagos alveolares (MA) a primeira linha de defesa do hospedeiro para controlar o microrganismo e prevenir a infeção. Como células fagocíticas, os MA reconhecem padrões moleculares dos patógenos, localizados à superfície dos microrganismos, através de recetores de reconhecimento (PRR, do inglês, *Recognition Pattern Receptors*). Este reconhecimento, conduz à ativação do macrófago com subsequente fagocitose e/ou fusão do fagolisossoma, levando à degradação dos organismos estranhos. Além disso, os MA ativos são capazes de ativar linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, despoletando respostas imunitárias adaptativas.

Dentro dos recetores dos MA, a glicoproteína *major* de superfície de *Pneumocystis* (Msg, do inglês, *Major surface glycoprotein*) é capaz de se ligar ao recetor da manose, devido à sua superfície fortemente glicosilada. Este antigénio de superfície é bastante relevante no processo imunológico da pneumocistose pois existem mais de 100 genes a codificar esta glicoproteína, mas somente é expressa uma isoforma, num dado momento da infeção. O β -glucano, presente na parede quística de *Pneumocystis*, também é capaz de fazer a ativação macrofágica por ligação aos recetores do β -glucano. A interação destes recetores com os respetivos antigénios de superfície do microrganismo conduz à ativação dos MA e ao aumento dos níveis de transcrição de citocinas como o TNF- α , a IL-6 e a proteína inflamatória de macrófagos, o que leva ao recrutamento de células do sistema imunitário. Outra classe de PRR em MA, conhecidos por desempenhar papéis importantes na resposta inflamatória à PPC, são os recetores *Toll-like*. Semelhantes a estes, os recetores *scavenger*, pertencem a uma classe de recetores encontrados em macrófagos que controlam a resposta inflamatória a *Pneumocystis*.

Uma vez fagocitado, *Pneumocystis* é facilmente destruído pelos MA saudáveis. A pressão oxidativa dos macrófagos, a liberação de óxido nítrico e de intermediários reativos de azoto, têm mostrado ser os mecanismos principais responsáveis pela destruição de *Pneumocystis* no interior do fagócito.

Além dos MA, também as células dendríticas são importantes células imunitárias efetoras no pulmão. Situadas no epitélio das vias aéreas, nos septos alveolares e ao redor dos vasos pulmonares, estas células são rápidas a responder aos antígenos inalados. Como células apresentadoras de antígenos, quando ativadas produzem citocinas e migram para os gânglios linfáticos, onde ativam as respostas das células T aos antígenos.

Por seu lado, os neutrófilos estão associados ao processo inflamatório e, por conseguinte, têm sido relacionados com a evolução da severidade da doença. Com efeito, a inflamação e a diminuição da função pulmonar causada por *Pneumocystis* nos pulmões de indivíduos seropositivos para o VIH foram correlacionados com contagens altas de neutrófilos.

Por fim, as células epiteliais do pulmão são fundamentais na patogénese da infeção por *Pneumocystis*, uma vez que os pneumócitos do tipo I, são as células de eleição para a adesão do microrganismo. Esta ligação é facilitada pelas interações a fibronectina e vitronectina do hospedeiro, que se ligam à superfície de *Pneumocystis* e permitem a incorporação de recetores de integração que estão presentes no epitélio alveolar. Como todas as células epiteliais, as do pulmão são capazes de secretar citocinas inflamatórias e quimiocinas, em resposta ao *stress* causado pelo agente patogénico.

1.4.2.2 A imunidade adaptativa

1.4.2.2.1 Imunidade adaptativa celular

A resposta imune do hospedeiro durante a PPc envolve interações complexas entre as células T CD4⁺, T CD8⁺, MA, células dendríticas, neutrófilos e mediadores solúveis que, juntos, facilitam a resolução da infeção.

Dessas populações de células, as células T CD4⁺ são absolutamente críticas para a resolução da pneumonia, desempenhando um papel central nas funções de células de memória que coordenam a resposta inflamatória do hospedeiro, pelo recrutamento e

ativação de células efectoras, responsáveis pela eliminação do organismo (Kelly & Shellito, 2010).

Os níveis de linfócitos T CD4⁺ são bastante críticos no contexto desta doença, pois a esmagadora maioria dos doentes com PPc apresentam um défice acentuado destas células (Dei-Cas, 2000; Barry & Johnson, 2001). Estudos com modelos animais com imunodeficiência severa combinada demonstraram que a perda das células T CD4⁺ torna os mamíferos altamente suscetíveis à infeção pulmonar por *Pneumocystis*. Na verdade, a pneumonia causada por este fungo é bastante mais frequente quando a contagem de células T CD4⁺ cai abaixo de 200 células/mm³, como é o caso de muitos doentes com sida (Phair *et al.*, 1990; Shellito *et al.*, 1990; Kelly & Shellito, 2010).

As células T CD8⁺ funcionam em conjunto com as células T CD4⁺ numa resposta imunitária normal, eficaz contra a infeção por *Pneumocystis*. No entanto, tem havido muito debate sobre se o seu envolvimento é protetor ou prejudicial, particularmente nas situações de deficiência de células T CD4⁺ (Gigliotti *et al.*, 2006). Estudos demonstraram que as células T CD8⁺ podem ser protetoras contra a infeção por *Pneumocystis*, embora estejam dependentes das células citotóxicas, as quais são produzidas na presença de níveis elevados de IFN- γ endógeno (Li *et al.*, 1997).

1.4.2.2 Imunidade adaptativa humoral

Embora o maior fator de risco para o desenvolvimento da PPc seja a falta de imunidade relacionada com as células T, há evidências de que as células B e as respostas específicas com anticorpos contra *Pneumocystis* também desempenham um papel importante contra este microrganismo (Meuwissen *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 1995).

Estudos serológicos realizados em humanos (Vargas *et al.*, 2001) mostraram que a presença de anticorpos contra *Pneumocystis* são facilmente detetados em seres humanos a partir de uma idade muito jovem. Um estudo que analisou, por *immunoblotting*, 680 amostras de soro de adultos saudáveis, em várias regiões do mundo, mostrou que a prevalência geral de anticorpos para *Pneumocystis* foi de 76 % (Smulian *et al.*, 1993).

Apesar do facto da análise serológica estar disponível há já muitos anos, a sua aplicação clínica tem sido limitada por inicialmente se considerar que os indivíduos

imunocomprometidos (seropositivos para VIH) infetados por *P. jirovecii* não conseguiam desenvolver uma resposta humoral adequada (Walzer, 1999). Contudo, estudos mais recentes com recurso a testes ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), têm determinado que os seropositivos para VIH com PPc têm maior (Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011) quantidade de IgG anti-*Pneumocystis* específicas, comparativamente a indivíduos seronegativos para VIH com PPc, o que demonstra que os doentes seropositivos para VIH são capazes de desenvolver uma resposta humoral contra *Pneumocystis*. Recentemente, estudos demonstraram que fatores como a localização geográfica (Daly *et al.*, 2009), episódios anteriores de PPc e a idade (Walzer *et al.*, 2009) são parâmetros com influência na resposta humoral destes doentes. Estudos em animais têm determinado que os anticorpos séricos predominantes são imunoglobulinas da classe G, A e M (IgG, IgA e IgM) (Walzer & Rutledge, 1981).

Hoje em dia, o facto de existirem estudos que provam que antigénios recombinantes anti-*P. jirovecii* são reconhecidos por anticorpos séricos, confere-lhes um enorme potencial de aplicação em estudos serológicos (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013). Num desses estudos (Daly *et al.*, 2002), três fragmentos recombinantes de sobreposição, que abrangem todo o comprimento da Msg de *P. jirovecii* foram gerados: MsgA, MsgB e MsgC. Foi possível verificar, com relevância estatística, que soros de doentes seropositivos para VIH com episódio prévio de PPc, reconheciam a fração MsgC com maior frequência (59 %) do que doentes que nunca experimentaram a doença (28 %). No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre doentes com ou sem PPc em relação aos outros fragmentos Msg. Estes dados vêm suportar a importância do papel dos anticorpos na defesa do hospedeiro contra a PPc e sugerem que os epítomos que estimulam pelo menos parte destes anticorpos, podem estar localizados na região correspondente à fração recombinante MsgC.

Outro estudo, demonstrou a presença de altos níveis de anticorpos IgG para diferentes variantes da fração MsgC (MsgC1, MsgC2, MsgC8, MsgC9) em indivíduos cuja doença definidora de sida foi a PPc, sugerindo a existência de uma resposta

humoral face à fração MsgC de *P. jirovecii*, que pode vir a ser útil na identificação da infecção aguda e/ou recente de PPc (Gingo *et al.*, 2011). Por outro lado, este estudo demonstrou ainda a existência de uma resposta humoral face a outro antígeno de superfície de *Pneumocystis*, a protéase KEX1 (do inglês, *kexin-like serine protease*).

Com o surgimento de resultados promissores nesta área, a imunidade humoral deve ser tida em conta, face à sua possível utilidade no diagnóstico e controlo epidemiológico desta doença, bem como no reconhecimento de moléculas antigénicas com potencial de imunização, que podem ser utilizadas em estudos de desenvolvimento de vacinas contra *P. jirovecii*.

1.5 Antígenos de Superfície de *Pneumocystis jirovecii*

Os antígenos de superfície de *Pneumocystis* têm recebido bastante atenção dos investigadores por dois motivos. Primeiro, porque estes antígenos residem na interface entre o hospedeiro e o agente patogénico, pelo que têm um papel crucial tanto para o agente como para o hospedeiro, principalmente na sua resposta imunitária. Em segundo lugar, estes antígenos estão acessíveis, sendo proteínas abundantes que se concentram na superfície celular, uma parte da célula que é relativamente fácil de isolar e, portanto, de estudar (Stringer, 2005).

As principais proteínas antigénicas de superfície de *P. jirovecii* encontradas, quer nos trofozoítos, quer nos quistos, são as glicoproteínas *major* de superfície (Msg), que representam a grande maioria dos antígenos de superfície do organismo (Stringer, 2005). A sua caracterização bioquímica revelou que são um complexo de proteínas altamente glicosiladas com hidratos de carbono ricos em manose, apresentando uma massa molecular de 90-120 kDa. Vários estudos evidenciam a envolvimento deste antígeno de superfície na interação parasita-hospedeiro, por interação com moléculas do hospedeiro como a fibronectina, a vitronectina e surfatantes, bem como um papel na ligação a células epiteliais alveolares (Stringer, 2005).

O genoma de *P. jirovecii* possui, aproximadamente, 100 genes que codificam para diferentes Msg, no entanto, apenas uma isoforma de Msg é expressa, num dado momento da infecção, sendo que a mesma pode ser alterada no decorrer da infecção. Os estímulos que conduzem a este fenómeno não foram, até ao momento, esclarecidos, mas esta variação parece ocorrer através de um mecanismo de regulação da transcrição e de

um rearranjo genômico complexo, que resulta em uma expressão variante de genes *MSG* (Stringer & Keely, 2001).

Uma série de estudos que utilizaram fragmentos *Msg* recombinantes que cobrem a região codificadora da proteína completa, têm mostrado resultados promissores em testes de diagnóstico e estudos epidemiológicos (Daly *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Walzer *et al.*, 2009). De particular interesse é a utilização de um fragmento relativamente conservado que codifica a região carboxilo-terminal (fração *MsgC*) (Daly *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Djawe *et al.*, 2010), pois doentes seropositivos para VIH com PPc ativa têm demonstrado títulos significativamente mais altos de anticorpos para esta região, do que doentes com pneumonia devido a outras causas.

Recentemente, outro antigénio de superfície que tem sido analisado diz respeito a uma enzima (protéase KEX1), que se pensa desempenhar importantes funções no processamento pós-transcricional de outras proteínas, em especial das proteínas de superfície, como as *Msg*, estando, por isso, envolvida nos processos moleculares que conduzem à invasão das células hospedeiras (Stringer, 2005). Um estudo recente sugere que os derivados recombinantes desta enzima de *Pneumocystis*, podem ser um alvo útil para estudos serológicos (Gingo *et al.*, 2011).

Outro antigénio de superfície sobre o qual já existe alguma informação é o p55, que contém 414 aminoácidos e um domínio característico composto por dez cópias de um motivo de sete aminoácidos, rico em resíduos de ácido glutâmico. A proteína resultante da expressão do seu DNA complementar é reconhecida por anticorpos quer de ratos quer de humanos infetados com *Pneumocystis*, e normalmente encontra-se expressa à superfície do organismo, encoberta por outros componentes da parede celular, que podem ser removidos pela ação da β -1,3-glucanase (Stringer, 2005).

Por fim, um quarto antigénio de superfície já descrito, é composto por um grupo de proteínas denominado MRS (do inglês, *Major Surface glycoprotein Related*), que se considera estar relacionado com as *Msg*. O número de genes correspondente a este grupo proteico não é ainda conhecido, mas a sua localização é próxima dos genes *MSG*. Este antigénio de superfície está pouco caracterizado, sabendo-se apenas que a sua massa molecular ronda os 90-115 kDa e que aproximadamente 10 % dessa massa está associada a uma glicosilação da sua extremidade N- terminal (Stringer, 2005).

1.6 Diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

1.6.1 Diagnóstico presuntivo

Para o diagnóstico presuntivo da PPc, são considerados diversos parâmetros clínicos que no seu conjunto podem ser indicativos da doença. A apresentação do quadro clínico (sinais e sintomas), os testes de função pulmonar, a gasometria arterial, os exames radiológicos e laboratoriais inespecíficos, são os elementos que compõem o fundamento do diagnóstico presuntivo (Calderón *et al.*, 2010).

Os doentes com PPc, de um modo geral, desenvolvem sinais e sintomas como dispneia, que aumenta ao longo do tempo, tosse não produtiva ou com expectoração clara, febre baixa ou ausência de febre, mal-estar, e, por vezes, sensação de aperto ou dor no peito. No entanto, o quadro clínico é variável de pessoa para pessoa e, muitos outros processos infecciosos, e mesmo não infecciosos, podem ter apresentação clínica semelhante (Thomas & Limper, 2004; Calderón *et al.*, 2010).

As características clássicas de um exame radiológico em doentes com PPc, com e sem infeção VIH, traduzem-se por um infiltrado intersticial bilateral e simétrico que se torna mais homogéneo e difuso à medida que a gravidade da infeção aumenta (Thomas & Limper, 2004; Calderón *et al.*, 2010).

Sendo a pneumocistose uma patologia que provoca graves dificuldades nas trocas gasosas que ocorrem no pulmão, a gasometria arterial dada pela pressão parcial de oxigénio (PaO₂) no sangue periférico, quando inferior a 65 mmHg, é indicativa da presença desta patologia (Barry & Johnson, 2001).

Níveis séricos elevados da enzima lactato desidrogenase (LDH, do inglês *Lactate Dehydrogenase*) têm sido relacionados com a PPc, provavelmente por estes níveis estarem associados à lesão celular e, conseqüentemente, a situações de lesão parenquimatosa pulmonar (Esteves *et al.*, 2014a). No entanto, o aumento dos níveis de LDH não é específico quer da PPc quer da lesão do parênquima pulmonar, podendo estar associado a outras doenças (Calderón *et al.*, 2010; Vogel *et al.*, 2011).

Outras estratégias de diagnóstico, como a medição dos níveis serológicos do β -1,3-glucano, do antigénio KL-6 (do inglês, *Krebs von den Lungen-6*) ou da S-adenosilmetionina (SAM), já foram propostas. O β -glucano é o principal componente estrutural da parede celular de quistos de *Pneumocystis* (Finkelman, 2010) e, níveis séricos elevados deste composto têm sido observados em doentes com PPc

(Teramoto *et al.*, 2000; Tasaka *et al.*, 2007; Finkelman, 2010; Held *et al.*, 2011; Morris & Masur, 2011; Esteves *et al.*, 2014a) tendo, de forma consistente, esses níveis diminuído com o tratamento anti-*Pneumocystis* (Teramoto *et al.*, 2000). Por conseguinte, o doseamento serológico do β -glucano parece ser um bom marcador de infecção por *Pneumocystis*. Outros estudos demonstraram que, os níveis serológicos do antigénio KL-6, uma glicoproteína tipo mucina proeminente em pneumócitos alveolares do tipo II, estão aumentados em doentes com PPc, tornando este antigénio um potencial indicador de pneumocistose (Hamada *et al.*, 1998; Tasaka *et al.*, 2007). Por outro lado, os níveis serológicos de SAM, um importante intermediário metabólico, têm mostrado resultados dúbios, pois alguns autores sugerem que a presença de baixos níveis de SAM no sangue de doentes com PPc, pode ser associada à presença da doença, baseando-se no facto de *Pneumocystis*, ao contrário de quase a totalidade dos outros agente patogénicos, ter a necessidade de captar SAM exógena, uma vez que não é capaz de a produzir endogenamente (Skelly, Holzman & Merali, 2008). No entanto, outros autores vêm contrariar esta afirmação, demonstrando a presença de um gene da SAM no genoma de *Pneumocystis* (Kutty *et al.*, 2008).

O diagnóstico clínico da PPc é complexo pois nenhuma combinação de sintomas, achados radiológicos, exames gasométricos ou níveis séricos de metabolitos serológicos é específica de infecção por *P. jirovecii*. Como tal, a identificação dos organismos infetantes ou do seu DNA numa amostra clinicamente relevante, é necessária para fazer um diagnóstico definitivo.

1.6.2 Diagnóstico definitivo

1.6.2.1 Detecção microscópica de *Pneumocystis jirovecii*

Estes microrganismos são detetáveis em amostras obtidas por métodos invasivos como biópsias de tecido ou lavados broncoalveolares (LBA), e em fluidos corporais obtidos de forma menos invasiva como a expetoração induzida (EI), a expetoração espontânea, o lavado oral (LO), as secreções brônquicas ou o aspirado nasofaríngeo (Barry & Johnson, 2001). Estas amostras biológicas podem ser analisadas por microscopia ótica ou de fluorescência (imunofluorescência), ou por métodos moleculares.

Através da microscopia ótica, vários métodos de coloração histoquímica estão descritos para a pesquisa deste microrganismo. *P. jirovecii*, especialmente os quistos maduros, podem ser detetados pela coloração com metenamina prata, azul de toluidina ou calcoflúor (Calderón *et al.*, 2010). Estes corantes têm boa afinidade para os componentes da parede do quisto. Assim, a metenamina prata, corante histoquímico de referência para o diagnóstico da PPc, cora de cinzento-escuro a parede dos quistos, não corando o seu conteúdo ou os trofozoítos (ver figura 5A). A coloração pelo azul de toluidina, deixa a parede quística corada de azul claro enquanto o calcoflúor permite uma coloração fluorescente da parede quística (ver figura 5C). Quer a coloração pelo Giemsa, quer a técnica modificada de coloração pelo Giemsa (*Diff-Quick*), permitem a coloração dos trofozoítos e dos corpos intraquísticos, que apresentam o núcleo corado de vermelho, rodeado por um citoplasma azulado (figura 5B) (Calderón *et al.*, 2010). No entanto, a leitura destas técnicas necessitam de um observador experiente e treinado, pois pode surgir interferências de coloração inespecíficas e/ou de leitura ambígua (Calderón *et al.*, 2010).

Além destas técnicas, a microscopia de fluorescência veio permitir o desenvolvimento de técnicas de imunofluorescência direta e indireta para detecção de *P. jirovecii* (Calderón *et al.*, 2010). Esta técnica fundamenta-se na ligação de anticorpos monoclonais específicos, marcados com moléculas fluorescentes como a fluoresceína, a antigénios de superfície de *Pneumocystis* (ver figura 5D). Por observação no microscópio de fluorescência, a detecção do agente infetante faz-se pela emissão da cor característica, fornecida pelas moléculas fluorescentes excitadas acopladas ao anticorpo que fez o seu reconhecimento, quando expostas a uma fonte de luz com o devido comprimento de onda (475 nm), e pela observação das formas características de *P. jirovecii*. Devido à sua fiabilidade, a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) é a técnica mais utilizada no diagnóstico da PPc (Baughman *et al.*, 1989; Lautenschlager *et al.*, 1996; Bava, Cattaneo & Bellegarde, 2002).

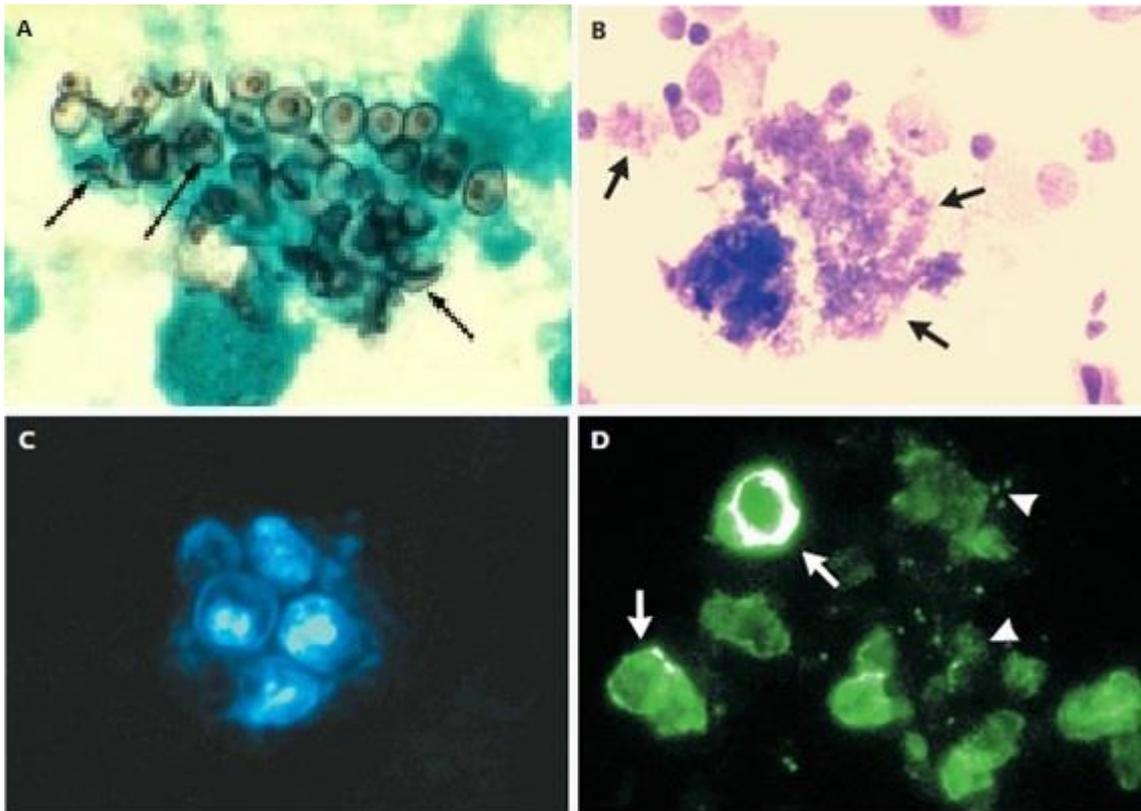


Figura 5. Detecção de diferentes formas de *Pneumocystis* utilizando diferentes colorações. Painel A – Quistos de *Pneumocystis* corados com metenamina prata; Painel B – Trofozoítos de *Pneumocystis* corados com Giemsa; Painel C - Quistos de *Pneumocystis* corados com calcoflúor; Painel D – Quistos (setas completas) e trofozoítos (cabeças de setas) corados por imunofluorescência (adaptado de Thomas & Limper, 2004)

1.6.2.2 Detecção molecular de *Pneumocystis jirovecii*

Num laboratório clínico, a utilização de métodos moleculares prende-se com o aumento da sensibilidade de deteção dos microrganismos, a fim de estabelecer o diagnóstico da PPC o mais cedo possível e com a possibilidade de recurso a amostras menos invasivas. A técnica de PCR (do inglês, *polimerase chain reaction*) é altamente eficaz na amplificação de DNA de *Pneumocystis* em diversos tipos de amostras clínicas (LBA, EI, expetoração espontânea, LO, secreções brônquicas, aspirados nasofaríngeos, soro e sangue) (Wakefield *et al.*, 1990; Durand-Joly *et al.*, 2005).

A deteção molecular de *P. jirovecii* para fins de diagnóstico, consiste na amplificação de um segmento de DNA específico, a subunidade grande do RNA ribossómico mitocondrial (*mtLSUrRNA*), através da técnica de PCR-*nested*, descrita anteriormente por Wakefield *et al.*, 1990. Recentemente, técnicas de PCR quantitativo,

em tempo real (RT-qPCR), foram também descritas para detecção de *P. jirovecii* em amostras biológicas. A vantagem desta metodologia é que, para além dos resultados qualitativos em relação à presença do microrganismo, permite também a quantificação dos mesmos (Arcenas *et al.*, 2006; Huggett *et al.*, 2008).

Um problema significativo da utilização do diagnóstico molecular é levantado pela dificuldade em distinguir casos de colonização por *P. jirovecii* de casos de doença (Huggett *et al.*, 2008). De facto, um resultado positivo de PCR relacionado com um teste de microscopia negativa pode dizer respeito tanto a um caso de colonização, como a uma PPc recente. Na prática comum, esta dificuldade é muitas vezes resolvida com base numa avaliação clínica cuidadosa.

1.6.2.3 Outros métodos de diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

A eficácia da microscopia depende principalmente dos meios e tecnologia disponíveis, assim como do tipo de amostra, da coloração utilizada e da experiência do microscopista. A interpretação do diagnóstico da PPc por métodos moleculares pode, por vezes, ser difícil quando os resultados da microscopia não são concordantes (Calderón *et al.*, 2010). Em virtude do exposto, a detecção de anticorpos séricos poderá constituir uma estratégia a considerar no diagnóstico da PPc, mesmo em doentes imunocomprometidos.

Essa estratégia, no entanto, raramente tem sido utilizada no diagnóstico da PPc pois sabe-se que indivíduos saudáveis apresentam, frequentemente, níveis significativos de anticorpos anti-*Pneumocystis* no soro (Smulian *et al.*, 1993). Por outro lado, ensaios de imunodeteção de anticorpos anti-*Pneumocystis*, como as técnicas imunoenzimáticas e/ou as técnicas de *immunoblotting*, especialmente aquelas que utilizam antigénios recombinantes deste agente, têm-se revelado uma ferramenta interessante em estudos epidemiológicos e uma hipotética ferramenta de diagnóstico (Daly *et al.*, 2002; Bishop & Kovacs, 2003; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Daly *et al.*, 2009; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011; Blount *et al.*, 2012; Djawe *et al.*, 2013).

1.7 Prevenção e tratamento da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

1.7.1 Profilaxia

A profilaxia contra a PPc pode ser dirigida contra a infecção primária (primeiro episódio), ou secundária (recaídas).

Na profilaxia primária, diretrizes recomendam o seu início em adolescentes e adultos infetados pelo VIH, incluindo mulheres grávidas e doentes submetidos a TARV, quando a contagem de células T CD4⁺ é inferior a 200 células/mm³, ou quando o doente apresenta história clínica de candidíase orofaríngea ou outras infeções oportunistas indicadoras de imunossupressão (Calderón *et al.*, 2010). A profilaxia primária deve ser interrompida em doentes seropositivos para VIH que respondam à TARV, com aumento na contagem de células T CD4⁺ para valores superiores a 200 células/mm³, durante mais de três meses. No entanto, se a contagem de células T CD4⁺ diminuir para valores inferiores a 200 células/mm³, a profilaxia deve ser reintroduzida (Calderón *et al.*, 2010).

No que respeita aos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, os dados são limitados e, nesses doentes, a duração ideal da quimioprofilaxia não está estabelecida, devendo ser mantida enquanto as condições imunossupressoras permanecerem ativas (Calderón *et al.*, 2010).

A profilaxia secundária também deve ser instituída em doentes seropositivos para VIH que tenham já desenvolvido episódios anteriores de PPc (Thomas & Limper, 2004). Esta quimioprofilaxia deve ser interrompida, quando estes doentes apresentarem uma contagem de células T CD4⁺ acima de 200 células/mm³ por um período de, pelo menos, três meses, como resultado da TARV. Caso a contagem diminua novamente abaixo das 200 células/mm³, a profilaxia deve ser reintroduzida (Calderón *et al.*, 2010).

Fármacos como o Trimetoprim-Sulfametoxazol (TMP-SMZ), a pentamidina, a dapsona e a atovaquona, podem ser utilizados na profilaxia contra a PPc. No entanto, a associação TMP-SMZ é o agente profilático (primário) recomendado, tanto para os seropositivos para VIH, como para os imunocomprometidos seronegativos para VIH, devido à sua alta eficácia, relativa segurança, baixo custo e amplo espectro antimicrobiano (Calderón *et al.*, 2010).

1.7.2 Tratamento

Não há uma abordagem universalmente aceita no tratamento de doentes com suspeita de PPc. No entanto, como a PPc pode ser rapidamente progressiva e a taxa de mortalidade associada é alta, particularmente nos doentes imunocomprometidos seronegativos para VIH, o seu tratamento precoce é essencial (Calderón *et al.*, 2010).

A classificação de doentes com PPc em doença leve, moderada ou grave, fornece uma orientação quanto à escolha do fármaco para o tratamento e ajuda a decidir se uma terapia adjuvante com corticosteroides é indicada. O uso de corticosteroides pode reduzir a inflamação pulmonar, sendo esta terapia adjuvante altamente recomendada em doentes que apresentem graus moderados ou elevados de hipoxia (Calderón *et al.*, 2010). Outro fator que influencia a escolha do tratamento está relacionado com a toxicidade dos fármacos e com o desenvolvimento de resistências contra os mesmos.

A combinação de fármacos utilizada como referência (primeira linha) no tratamento da PPc, independentemente da forma de apresentação e da gravidade da infeção, é o TMP-SMZ. Nos casos de hipersensibilidade ou de resposta inadequada à terapêutica, o combate à infeção pode ser feito com recurso à ação de fármacos alternativos (segunda linha), apresentados no quadro 1 (Calderón *et al.*, 2010).

Quadro 1. Fármacos utilizados no tratamento da pneumocistose e suas respetivas ações (adaptado de Calderón *et al.*, 2010)

Fármaco	Severidade da PPc	Linha de tratamento	Ação
TMP-SMZ	Ligeira a grave	1 ^a	Inibição da via metabólica dos folatos
Pentamidina	Ligeira a grave	2 ^a	Inibição da via metabólica do ácido para-aminobenzóico; da glicólise anaeróbia; da fosforilação oxidativa; da síntese proteica
Primaquina-clindamicina	Ligeira a moderada	2 ^a	Inibição da síntese proteica e da cadeia respiratória
Dapsona-TMP	Ligeira a moderada	Alternativa de 2 ^a	Inibição da síntese da via metabólica dos folatos
Atovaquona	Ligeira a moderada	Alternativa de 2 ^a	Inibição citocromo b
Trimetrexato	Ligeira a moderada	Alternativa de 2 ^a linha	Inibição da via metabólica dos folatos

1.8 Diagnóstico serológico da pneumocistose: produção de um antígeno recombinante sintético multiepítopo para imunodeteção de anticorpos anti-*Pneumocystis jirovecii*.

1.8.1 Justificação

A PPc é uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em imunocomprometidos, principalmente nos seropositivos para VIH. Desta forma, reveste-se de grande interesse o diagnóstico precoce desta infeção, por forma a instaurar a terapêutica adequada o mais cedo possível.

Atualmente, os meios laboratoriais de referência para o diagnóstico da PPc baseiam-se fundamentalmente na deteção direta de *P. jirovecii* em amostras pulmonares, o que implica a realização de exames invasivos com recurso a broncofibroscopia que, com frequência, colocam em risco a vida dos doentes, já por si muito debilitada. Assim, o desenvolvimento de um teste serológico sensível e fiável, capaz de determinar a presença de infeção por *P. jirovecii*, seria útil como um teste de diagnóstico não invasivo e como uma ferramenta epidemiológica. Em particular, o desenvolvimento de um método que permitisse distinguir infeção passada por *P. jirovecii* de doença ativa ou colonização, seria particularmente útil.

Estudos recentes com recurso a antígenos recombinantes específicos de *P. jirovecii* e a técnicas de imunodeteção de anticorpos, estão a produzir resultados promissores nesta área. Em virtude do exposto, é nessa perspetiva que surge a pretensão de se produzir um novo antígeno recombinante sintético multiepítopo da fração MsgC de *P. jirovecii*, como ferramenta para pesquisa de anticorpos específicos contra o agente, por técnica de ELISA.

1.8.2 Objetivos

Com o presente trabalho de investigação, pretende-se produzir um antígeno recombinante sintético multiepítopo específico de *P. jirovecii* e, com recurso a este antígeno, otimizar um método ELISA com pesquisa de anticorpos totais e das frações IgM e IgG anti-*P. jirovecii*, para diagnóstico da PPc.

Capítulo 2

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

A metodologia aplicada neste trabalho está esquematizada na figura 6 e consistiu em:

2.1 Escolha e produção de um antígeno recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii*;

2.2 Clonagem do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii* em *E. coli* TOP10;

2.3 Construção de um vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii*;

2.4 Expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii*;

2.5 Purificação do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii*;

2.6 Caracterização da amostragem;

2.7 Aplicação do antígeno recombinante sintético multiepítopo no desenvolvimento de um teste ELISA para detecção de anticorpos totais, IgG e IgM anti-*P. jirovecii*;

2.8 Análise dos dados.

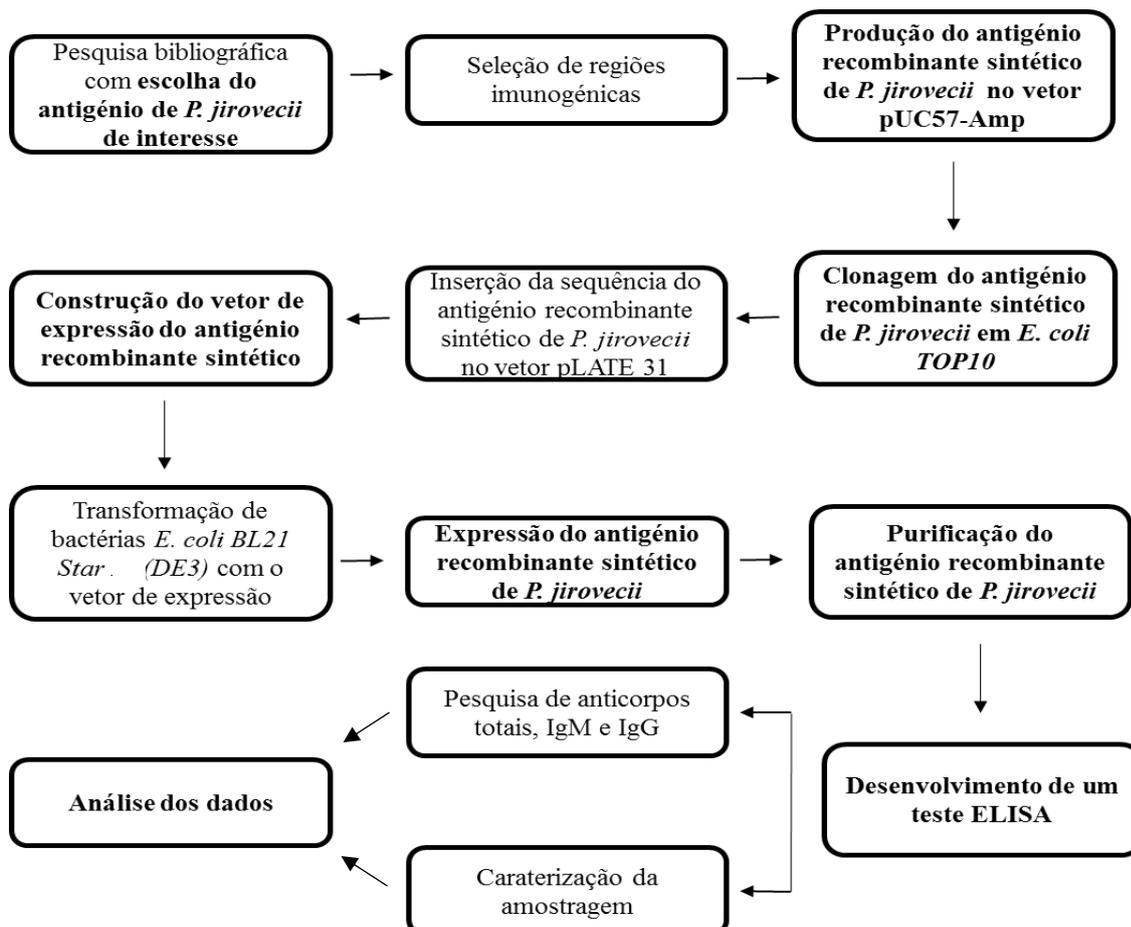


Figura 6. Fluxograma da metodologia aplicada no presente estudo.

2.1 Escolha e produção de um antígeno recombinante sintético multiepítopo de *Pneumocystis jirovecii*

2.1.1 Escolha do antígeno recombinante a sintetizar

A pesquisa bibliográfica efetuada permitiu a compilação de informação sobre o interesse das propriedades antigénicas da glicoproteína *major* de superfície Msg de *P. jirovecii*, assim como da potencialidade da aplicação desta região em ensaios de imunodiagnóstico. Desta análise, destaca-se um estudo em particular (Daly *et al.*, 2002), no qual se investigou a resposta imunológica de indivíduos seropositivos para VIH com e sem história prévia de PPc e de dadores de sangue (controlo), face a três frações distintas da Msg de *P. jirovecii*: MsgA, MsgB, e MsgC. Observou-se que o título de anticorpos contra estas frações, em particular os títulos anti-MsgC, pode vir a ser um importante parâmetro de infeção, potencialmente mensurável e útil num futuro diagnóstico serológico da PPc.

Por outro lado, uma abordagem em que péptidos recombinantes foram desenhados, construídos, expressos e purificados, sendo posteriormente utilizados em ensaios imunológicos para deteção de *Toxoplasma gondii*, foi já realizada com sucesso por outros autores (Dai *et al.*, 2012).

Em virtude do exposto, estes estudos foram o ponto de partida para a abordagem experimental deste trabalho, baseada na produção e purificação de um antígeno recombinante sintético multiepítopo constituído por porções antigénicas reativas da fração MsgC de *P. jirovecii*, para aplicação no desenvolvimento de uma técnica de imunodeteção de anticorpos anti-*P. jirovecii*.

2.1.2 Confirmação da presença da fração MsgC em DNA de *Pneumocystis jirovecii*

No presente estudo, fez-se uma análise *online* da sequência da glicoproteína Msg, na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Para isso, efetuou-se uma pesquisa recorrendo-se às palavras-chave “*Major Surface Glycoprotein*” e “*Pneumocystis jirovecii*”. O resultado mais recente (fevereiro 2012) e com o maior fragmento descrito (1022 aminoácidos) foi selecionado (*GenBank*: AEZ01831.1). Com a sequência nucleotídica correspondente (*GenBank*: JN792933.1),

recorreu-se à ferramenta *online NCBI nucleotide blast*, confirmando-se a semelhança da sequência selecionada com outras sequências codificantes para o gene *MSG* anteriormente. Em seguida, procedeu-se à seleção de oligonucleótidos (*primers*) que permitissem a amplificação da região correspondente à fração *MsgC* do DNA de *P. jirovecii* por PCR. Para isso, teve-se em conta o *primer reverse* descrito por Daly *et al.* em 2002, tendo sido desenhado um novo *primer forward* recorrendo ao *software online Primer 3* (disponível em: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). A composição dos *primers* utilizados está detalhada no quadro 2.

Quadro 2. Composição dos *primers* utilizados no presente estudo para a amplificação da fração *MsgC*.

Primer forward: PjMSG_c Fw	5' GAAAGTACGTGTAAGCTGATGGTA 3'
Primer reverse: PjMSG_c Rv	5' TCAATTGATGCTGAAGAGATG 3' *
Tamanho da sequência a amplificar	1334 nucleótidos

* previamente descrito por Daly *et al.*, 2002.

Estes *primers* foram utilizados em reações de PCR, que permitiram a amplificação específica da sequência de interesse numa sequência molde de DNA de *P. jirovecii* extraído de amostras caracterizadas como *PPc* positivas, na população portuguesa. Esta técnica foi realizada recorrendo-se ao *kit LongRange PCR* da *QIAGEN*[®].

Na realização desta técnica foi utilizada a mistura reacional sumarizada no quadro 3, sendo que a amplificação de DNA foi feita no termociclador *Biometra*[®] *1 Thermocycler*, segundo as condições térmicas descritas no quadro 4.

Quadro 3. Composição da mistura reacional utilizada na amplificação por PCR *LongRange*.

Componente	Volume utilizado por reação
Água livre de RNase	15,1 µL
Tampão <i>LongRange PCR</i> com Mg ²⁺ (10x)	5 µL
Mix de dNTPs (10 mM cada dNTP)	2,5 µL
<i>Q-Solution</i> (5x)	10 µL
Primer PjMSG_c Fw (10 µM)	2 µL
Primer PjMSG_c Rv (10 µM)	2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	3 µL
Mix enzimático para LR-PCR	0,4 µL
Amostra de DNA	10 µL
Volume Final	50 µL

Quadro 4. Condições térmicas aplicadas na PCR *LongRange* para amplificação específica da fração MsgC de *P. jirovecii*.

Condições de amplificação	Nº de Ciclos
Desnaturação inicial 93 °C, 3 minutos	1
Desnaturação 93 °C, 30 segundos Ligação 50 °C, 1 minuto Extensão 68 °C, 6 minutos	45

Após PCR, o DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, para avaliação dos produtos de amplificação, segundo o procedimento laboratorial descrito no anexo 1 (pág. 116). As bandas com tamanho correspondente ao fragmento esperado foram excisadas do gel e recuperadas para posterior purificação e sequenciação. A sua purificação foi realizada recorrendo ao *kit JetQUICK Purification Spin kit* da *GENOMED*[®], cujo procedimento se encontra descrito no anexo 2 (pág. 117). A sequenciação dos fragmentos de DNA purificados foi efetuada num sequenciador ABI 3730XL, pela empresa Stabvida[®].

Os resultados das sequenciações foram analisados no programa bioinformático *Chromas Lite* versão 2.1.1 e o alinhamento de sequências foi efetuado recorrendo ao *software online MultAlin* (disponível em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Foi simultaneamente efetuado um *blast* com os produtos da sequenciação, para verificar a sua semelhança com outras sequências dos genes *MSG* anteriormente descritas.

2.1.3 Seleção das regiões de interesse e síntese do antígeno recombinante multiepítopo

Fez-se uma análise da sequência de aminoácidos correspondente à fração MsgC de *P. jirovecii*, procurando os epítomos com antigenicidade e reatividade mais previsível, conforme descrito por Dai *et al.* em 2012, para o estudo de *Toxoplasma gondii*.

Foi analisado o perfil de hidrofobicidade e a posição relativamente à membrana de 582 aminoácidos (*GenBank*: JN792933.1), correspondentes à porção final da fração MsgB e a toda a porção da fração MsgC (figura 7).

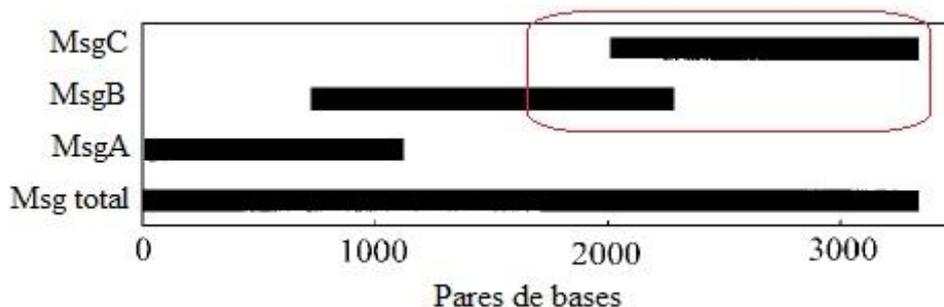


Figura 7. Esquema das frações recombinantes Msg comparativamente à Msg total. Sinalização a encarnado da região analisada neste estudo. Adaptado de Daly *et al.*, 2002.

Esta sequência de aminoácidos foi analisada, com recurso à ferramenta *online ExPASy – ProtScale* e ao *software online CBS – TMHMM* – versão 2.0, para estudo do perfil de hidrofobicidade utilizando a escala de *Kyle & Doolittle* e da posição membranar, respetivamente.

Feita a seleção das regiões com menor índice de hidrofobicidade e com uma posição previsível extra membranar, um péptido recombinante sintético composto por estas três regiões ligadas entre si por pontes de cinco resíduos de glicina, foi desenhado e posteriormente sintetizado e clonado, pela empresa *Nzytecn*[®], no vetor pUC57-Amp (ver figura 8), com a sequência otimizada para expressão em *E. coli*.

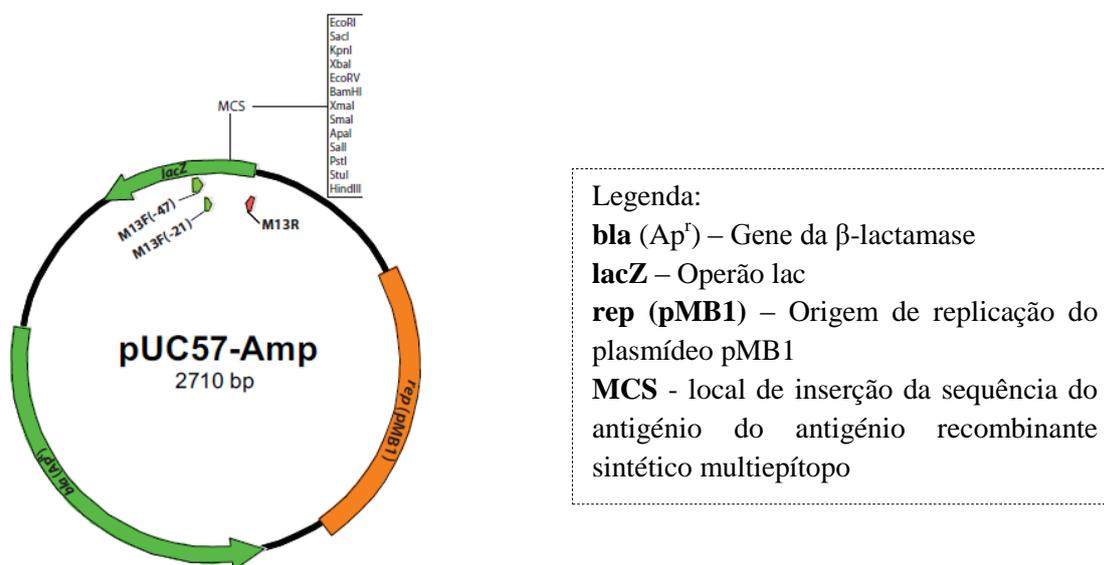


Figura 8. Esquema representativo do vetor de clonagem pUC57-Amp e dos seus constituintes genéticos, com representação do local de inserção da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo (MCS do inglês, *Multiple Cloning Site*).

Recorrendo à ferramenta *online ExPASy – ProtParam*, identificaram-se vários parâmetros físico-químicos do antigénio recombinante sintético multiepítipo.

2.2 Clonagem do antigénio recombinante sintético multiepítipo de *Pneumocystis jirovecii* em *E. coli* TOP10

Terminado o processo de síntese do antigénio recombinante sintético multiepítipo no vetor de clonagem pUC57-Amp, este foi clonado em bactérias *E. coli*. O processo de transformação decorreu de acordo com os seguintes passos:

- 1) Obtenção de células hospedeiras competentes;
- 2) Transformação das células competentes com o DNA recombinante;
- 3) Confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas, por PCR;
- 4) Purificação e sequenciação do DNA recombinante presente nas células transformadas.

2.2.1 Obtenção de células competentes de *E. coli* TOP10

Neste estudo, foram utilizadas células de *E. coli* TOP10 como células hospedeiras. Foi executado um protocolo, adaptado de Li *et al.*, 2010, que se baseia na utilização do cloreto de cálcio para obtenção de células competentes.

Método do cloreto de cálcio para obtenção de células competentes: Num passo inicial, foi preparada uma cultura celular de bactérias *E. coli* TOP10 através da inoculação de uma única colónia desta bactéria em 25 mL de meio líquido de *Luria-Bertani* (LB; 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl), que ficou a incubar durante 4 horas a 37 °C sob agitação orbital (170 rpm). Findo o processo de incubação, a cultura celular foi mantida em gelo durante pelo menos 5 minutos. De seguida, a cultura celular foi submetida a centrifugação a 4 °C durante 5 minutos a uma velocidade de 9000 g na centrífuga refrigerada Sigma® 3k15. O sedimento de células foi ressuscitado em 10 mL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,1 M a 4 °C. Seguiu-se uma incubação em gelo durante 20 minutos, após a qual uma centrifugação em condições semelhantes à realizada anteriormente foi

realizada, tendo o sedimento de células obtido sido ressuspensionado em 1,5 mL de uma solução de cloreto de cálcio a 4 °C, suplementada com glicerol (0,1 M CaCl₂/15 % de glicerol). Esta suspensão final foi redistribuída por vários tubos *ependorf* de 1,5 mL, ficando cada um com 100 µL de volume final. Os *ependorfs* foram imediatamente congelados a -80 °C ou utilizados no processo de transformação das células competentes.

2.2.2 Transformação de *E. coli TOP10* competentes com o vetor pUC57-Amp

As células produzidas no passo anterior foram postas em contacto com o vetor pUC57-Amp (ver figura 8, pág. 32) que contém a sequência codificante para o antigénio recombinante sintético multiepitopo. Para a transformação bacteriana, foi utilizado o método do choque térmico, adaptado de Singh *et al.*, 2010.

Transformação de *E. coli* competentes por choque térmico: Seleccionaram-se aleatoriamente cinco *ependorfs* com 100 µL de suspensão celular de *E. coli TOP10* competentes. A quatro destes *ependorfs* adicionou-se 1 µL de vetor (0,1 µg/µL) previamente diluído (1:10) e, ao *ependorf* restante, 1 µL de água desionizada estéril (*ependorf* controlo). As células incubaram em contacto com o plasmídeo durante 30 minutos, em gelo. Findo este período, foi efetuado o choque térmico às células, colocando-se os *ependorfs* num termociclador (*Biometra*[®] *1 Thermocycler*) a 42 °C. Dos quatro *ependorfs* aos quais foi adicionado o vetor plasmídico, o primeiro sofreu um choque térmico de 2 minutos, o segundo de 3 minutos, o terceiro de 4 minutos e o quarto de 5 minutos. O *ependorf* controlo sofreu um choque térmico semelhante ao primeiro. Ao saírem do termociclador, os *ependorfs* foram diretamente colocados em gelo e aí permaneceram durante 10 minutos. Estas suspensões celulares, agora transformadas, foram transferidas para *ependorfs* de 1,5 mL, que continham no seu interior 900 µL de meio líquido LB. Seguiu-se uma incubação durante 1 hora a 37 °C. As células foram centrifugadas durante 1 minuto a 7000 g, descartando-se parte do sobrenadante. O sedimento foi ressuspensionado em 100 µL do sobrenadante excedente e as células foram semeadas em placas de *petri* com meio sólido LB suplementado com ampicilina (50 mg/mL), onde incubaram durante 18 horas a 37 °C.

Após a incubação, foi feita a contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC) consoante o tempo de choque térmico fornecido e foi verificada a

ausência de crescimento na placa semeada com a mistura do *ependorf* controlo. Foram feitos isolamentos das colónias.

2.2.3 Confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas

Para a confirmação da presença de DNA recombinante nas células transformadas, realizou-se uma PCR, em duplicado, dirigida para a sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo, em amostras do vetor pUC57-Amp purificado e de colónias, selecionadas aleatoriamente, isoladas no passo anterior, pela técnica de PCR-colónia, que não necessita qualquer passo de pré-extração de DNA (Bergkessel & Guthrie, 2013). Para tal, foi utilizado um protocolo de PCR com os *primers* M13F(-21) e M13R (ver quadro 5) que amplificam a região de interesse, e uma mistura reacional que se encontra detalhada no quadro 6.

Quadro 5. Composição dos *primers* que permitem a amplificação da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo presente no vetor clonado em *E. coli TOP10*.

<i>Primer</i>	Composição
M13F(-21)	5'-d(TGT AAA ACG ACG GCC AGT)-3'
M13R	5'-d(CAG GAA ACA GCT ATG AC)-3'
Tamanho do amplicão	566 pb

Quadro 6. Composição da mistura reacional da PCR para amplificação da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo.

Componente	Volume utilizado por reação
Água esterilizada	33,80 µL
Tampão PCR (10x), <i>Bioline</i> [®]	5 µL
Mix de dNTPs (10 mM cada dNTP), <i>Applied biosystems</i> [®]	2 µL
<i>Primer</i> M13 Fw(-21) (10 µM), <i>MWG Biotech</i> [®]	1 µL
<i>Primer</i> M13 Rv (10 µM), <i>MWG Biotech</i> [®]	1 µL
MgCl ₂ (25 mM), <i>Bioline</i> [®]	5 µL
<i>TaqGold</i> (5 U/µL), <i>Applied biosystems</i> [®]	0,2 µL
Amostra de DNA	2 µL
Volume Final	50 µL

Para monitorizar a qualidade dos resultados em cada reação de amplificação, utilizou-se um controlo negativo que consistiu em água desionizada estéril. Este controlo substituiu, na respetiva mistura reacional, os 2 µL de amostra de DNA.

O protocolo foi efetuado numa câmara de fluxo laminar, tendo a reação decorrido num termociclador (Biometra® T1 Thermocycler), de acordo com as condições sumarizadas no quadro 7.

Quadro 7. Condições térmicas aplicadas na PCR para amplificação específica da sequência do antigénio recombinante sintético multiepítipo em *E. coli TOP10*, transformadas com o vetor pUC57-Amp.

Condições de amplificação	Nº de Ciclos
Ativação da polimerase 95 °C, 10 minutos	1
Desnaturação 95 °C, 30 segundos	40
Ligação 55 °C, 1 minuto	
Extensão 72 °C, 1 minuto	
Extensão final 72 °C, 1 minuto	1

Segundo o relatório do fabricante do vetor, o gene sintético foi clonado no vetor digerido com a enzima EcoRV (ver anexo 3, pág. 118). Em virtude do exposto, com conhecimento da sequência completa do vetor e com conhecimento do local de atuação da enzima EcoRV (ver quadro 8), foi possível conhecer o local de inserção do antigénio sintético (ver figura 9), assim como o esquema do amplicão resultante da amplificação da região de interesse com *primers* específicos, que corresponde a 566 pb.

Quadro 8. Representação do local de restrição da enzima EcoRV (▼) numa sequência nucleotídica.

Enzima de Restrição	Local de atuação
EcoRV	5'...G A T ▼ A T C... 3' 3'...C T A ▲ T A G...3'

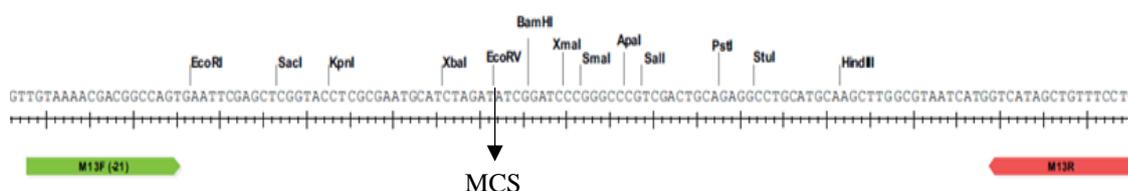


Figura 9. Representação da sequência amplificada pelos *primers* utilizados na reação de PCR, assim como do local de inserção do antigénio recombinante (MCS).

Terminada a PCR, o DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, para posterior avaliação dos produtos de amplificação. O protocolo utilizado encontra-se descrito no anexo 1 (pág. 116).

2.2.4 Purificação e sequenciação de DNA amplificado nas células transformadas

Todo o procedimento foi realizado à semelhança do que foi descrito anteriormente na secção 2.1.2.

2.2.5 Isolamento de DNA plasmídico de *E. coli TOP10* transformadas

Por forma a isolar o DNA plasmídico transformante de *E. coli TOP10*, cuja composição foi confirmada por sequenciação, recorreu-se ao protocolo *QIAprep Spin Miniprep Kit* da *QIAGEN*[®]. Em primeiro lugar, foram realizadas culturas bacterianas das células transformadas, em meio líquido LB suplementado com 1 µL/mL de ampicilina (50 mg/mL). Tubos *falcon* de 15 mL, com 5 mL de meio de cultura, foram inoculados com colónias transformadas isoladas e sofreram incubação a 30 °C durante 24 horas. Findo o período de incubação, 1 mL de cada cultura em tubo *falcon* foi transferido para tubos *ependorf* de 2 mL e foi-lhes adicionado glicerol para uma concentração final de 50 %, sendo de seguida congeladas a -20 °C. Os restantes 4 mL da cultura celular foram utilizados para purificação e isolamento do DNA plasmídico, em três passos sequenciais: lise alcalina das células bacterianas, seguida da adsorção de DNA plasmídico à membrana de sílica da coluna de purificação e, por fim, a eluição desse DNA plasmídico. O procedimento encontra-se detalhado no anexo 4 (pág. 120).

2.3 Construção de um vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo de *Pneumocystis jirovecii*

2.3.1 Seleção do vetor de expressão a utilizar

A construção de um vetor de expressão para o antígeno recombinante sintético multiepítipo de *P. jirovecii*, foi conseguida através da utilização do sistema de clonagem e expressão *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* da *Thermo Scientific*[®], que recorre à tecnologia *Ligation Independent Cloning* (LIC).

Neste projeto, a sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo foi adicionada ao vetor de expressão pLATE 31 do *kit* da *Thermo Scientific*[®], cujos componentes estão representados na figura 10 e detalhados no anexo 5. A inserção da sequência correspondente ao antígeno recombinante neste vetor de expressão permite a expressão do antígeno com uma cauda C-terminal de seis resíduos de histidina.

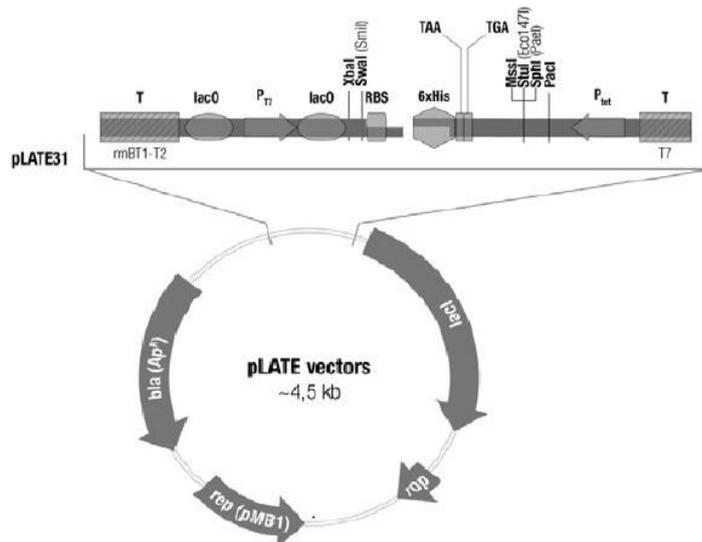


Figura 10. Representação do vetor pLATE 31 e da localização dos seus elementos genéticos constituintes.

2.3.2 Produção da sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítopo no vetor de expressão pLATE31

Para inserção da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo no vetor de expressão selecionado, foi gerado um produto de PCR com extremidades complementares às do vetor. Para tal, as indicações fornecidas pelo fabricante do vetor, para a construção dos *primers* capazes de fazerem a amplificação do fragmento a inserir, foram seguidas. Em virtude do exposto no quadro 9 e, tendo em consideração que o fabricante aconselha que a temperatura de *melting* da região do *primer* complementar ao gene de interesse seja de, pelo menos, 60 °C, foram projetados dois *primers* recorrendo-se ao *software online NCBI Primer Blast*. Foi tida em consideração a sequência específica completa do antígeno recombinante sintético multiepítopo que se pretendia inserir e desenharam-se dois *primers* que, posteriormente, foram construídos pela empresa *Eurofins MWG Operon*: um *primer* pLATE 31 *forward* e um *primer* pLATE 31 *reverse* (quadro 9).

Quadro 9. Sequência dos *primers* desenvolvidos que permitem a produção de um amplicão correspondente à sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo, no vetor de expressão pLATE 31.

Primer pLATE 31 forward	5'AGAAGGAGATATAACTATGGGCACCACCGAAAT CCTGA 3'
Primer pLATE 31 reverse	5'GTGGTGGTGATGGTGGTGGCCGCCACGCATCAC GGACCA 3'
Tamanho do amplicão	478 pb

Após o processo de desenho dos *primers*, foi otimizado um protocolo de PCR (quadro 10) de amplificação, semelhante ao utilizado na secção 2.2.3, onde foram aplicados os *primers pLATE31Fw* e *pLATE31Rv*, adequados à produção da sequência de interesse com as extremidades específicas para inserção no vetor de expressão pLATE31. Neste protocolo foram utilizadas quatro amostras de DNA plasmídico purificado a partir das células *E. coli TOP10* transformadas com o vetor pUC57-Amp, escolhidas aleatoriamente, nas quais anteriormente já tinha sido feita a confirmação da presença de DNA, correspondente ao antígeno recombinante sintético multiepítipo que se procura expressar.

Para monitorizar a qualidade dos resultados, cada amostra foi testada em duplicado e em cada reação de amplificação utilizou-se um controlo negativo, que consistiu em 2 µL água desionizada estéril em vez da amostra de DNA. As condições de reação encontram-se resumidas no quadro 11, tendo decorrido no termociclador *Biometra® T1 Thermocycler*.

Quadro 10. Composição da mistura reacional utilizada na PCR para produção da sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão pLATE 31.

Componente	Volume utilizado por reação
Água esterilizada	34,8 µL
Tampão PCR (10x), <i>Bioline®</i>	5 µL
Mix de dNTPs (10 mM cada dNTP), <i>Applied biosystems®</i>	2 µL
Primer pLATE31Fw (10 µM), <i>MWG Biotech®</i>	0,5 µL
Primer pLATE31Rv (10 µM), <i>MWG Biotech®</i>	0,5 µL
MgCl ₂ (25 mM), <i>Bioline®</i>	5 µL
<i>TaqGold</i> (5 U/µL), <i>Applied biosystems®</i>	0,2 µL
Amostra de DNA	2 µL
Volume Final	50 µL

Quadro 11. Condições térmicas aplicadas na PCR para produção da sequência de inserção do antígeno recombinante sintético multiepítopo no vetor de expressão pLATE 31.

Condições de amplificação	Nº de ciclos
Ativação da polimerase 95 °C → 10 minutos	1
Desnaturação 95 °C → 0,5 minutos Ligação 55 °C → 1 minutos Extensão 72 °C → 1 minutos	40
Extensão Final 72 °C → 10 minutos	1

Depois do processo de PCR estar completo, o DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose, com posterior avaliação dos produtos de amplificação, para confirmação da presença da sequência com o tamanho esperado de 478 pb (protocolo em anexo 1, na pág. 116). As bandas com tamanho correspondente ao fragmento esperado foram excisadas do gel e recuperadas para posterior purificação e sequenciação, conforme descrito na secção 2.1.2.

2.3.3 Construção do vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo em *E. coli* TOP10 e *INVα*

Para a construção do vetor de expressão a utilizar neste trabalho, procedeu-se à execução do protocolo de clonagem LIC, fornecido pelo *kit aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* da *Thermo Scientific*[®]. Em primeiro lugar, procedeu-se à geração das extremidades 5' e 3' necessárias no fragmento de PCR purificado que se pretendia clonar. Para isso preparou-se, à temperatura ambiente, a mistura reacional presente no quadro 12, com os reagentes fornecidos no *kit*. A mistura reacional foi incubada à temperatura ambiente (20-25 °C) durante 5 minutos. De seguida, a reação foi parada através da adição de 0,6 µL de EDTA 0,5 M.

Quadro 12. Composição da mistura reacional para síntese das extremidades complementares ao vetor de expressão, no fragmento de PCR purificado, correspondente à sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo a clonar.

Componente	Volume
Tampão LIC 5X	2 µL
Fragmento de PCR purificado	2 µL (0,1 pmol)
Água estéril	5 µL
DNA polimerase T4 (1 U/µL)	1 µL
Volume total	10 µL

Para iniciar a reação de hibridação do fragmento de interesse gerado com o vetor de expressão pLATE31, fez-se a adição de 1 µL de vetor pLATE 31 (60 ng, 0,02 pmol DNA) ao fragmento preparado nos passos anteriores. Homogeneizou-se a mistura com um *short spin* de 3-5 segundos e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora.

Terminado este procedimento e com a preparação prévia de *E. coli TOP10* e *INVα* competentes, foi possível iniciar a transformação das células com o vetor de expressão desenvolvido. Neste processo de transformação, foram adicionados 2,5 µL da mistura de hibridação a cada 50 µL de uma suspensão celular de bactérias competentes. Por forma a criar um controlo interno de transformação, a um *eppendorf* de suspensão celular foram adicionados 2,5 µL de água desionizada estéril fornecida pelo *kit*.

As suspensões celulares foram deixadas a incubar com o vetor de expressão durante 30 minutos em gelo e, findo este período, foi promovido um choque térmico, tal como descrito na secção 2.2.2.

Finalizado o processo de transformação, as células foram postas a incubar durante 1 hora a 37 °C, em agitação orbital (170 rpm), em meio líquido SOC suplementado com glucose (0,5 % de extrato de levedura, 2 % triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose). Terminada a incubação, foram feitos isolamentos em placas de *petri* com meio sólido LB suplementado com ampicilina (50 mg/mL) de 50, 100 e 150 µL de cada suspensão celular, por forma a se verificar a eficiência da transformação. O tubo com a cultura celular controlo foi processado do mesmo modo e, posteriormente, fez-se uma contagem das unidades formadoras de colónias (UFC) em todas as placas semeadas.

As colónias transformadas foram depois isoladas em meio sólido LB suplementado com ampicilina.

2.3.4 Confirmação da transformação de *E. coli TOP10* e *INVα* com o vetor de expressão e isolamento de DNA plasmídico

A confirmação da presença da sequência do antigénio recombinante sintético multiepítipo no DNA das bactérias transformadas com o vetor de expressão, foi realizada em duas colónias *INVα* e *TOP10* isoladas em meio sólido LB com ampicilina, escolhidas de forma aleatória. Para tal, foi utilizado um protocolo de PCR semelhante ao realizado na secção 2.3.2, recorrendo-se aos *primers* pLATE 31 *forward* e pLATE

31 *reverse*. Após obtenção de bandas de tamanho correspondente ao amplicão esperado (478 pb), foi efetuada a purificação das mesmas (anexo 2, pág. 117), seguida de sequenciação.

Após confirmação da presença da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo no DNA plasmídico das bactérias, o isolamento desse DNA foi feito através do protocolo *QIAprep Spin Miniprep Kit* da *QIAGEN*[®], enunciado no anexo 4 na pág. 120.

2.4 Expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *Pneumocystis jirovecii*

Por forma a se conseguir expressar o antígeno recombinante sintético multiepítopo, o seu vetor de expressão teve de ser inserido numa estirpe bacteriana adequada à sua posterior expressão.

2.4.1 Transformação de *E. coli BL21 Star (DE3)* competentes com o vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo

A transformação de *E. coli BL21 Star (DE3)* foi feita recorrendo-se ao produto das *minipreps* realizadas aquando da purificação enunciada na secção 2.3.4. Assim, a 150 µL de uma cultura celular de células de *E. coli BL21 Star (DE3)*, previamente tornadas competentes pelo método do cloreto de cálcio (ver secção 2.2.1), foi adicionado 1 µL de DNA plasmídico das células *E. coli TOP10* ou *INVα* transformadas com o vetor de expressão. Por forma a produzir um controlo interno de transformação, a um *ependorff* de suspensão celular de *E. coli BL21 Star (DE3)* foi adicionado 1 µL de água desionizada estéril.

O processo de transformação, assim como o processo de confirmação da presença da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo nas bactérias *BL21 Star (DE3)*, seguiu os passos dos protocolos anteriormente utilizados com as bactérias *TOP10* e *INVα*.

2.4.2 Indução da expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo

As células de *E. coli BL21 Star (DE3)* foram estimuladas de acordo com as recomendações do fabricante do *kit* de expressão *aLICator Ligation Independent*

Cloning and Expression System da *Thermo Scientific*[®]. Assim, após a obtenção de bactérias *BL21 Star (DE3)* transformadas com o vetor de expressão, selecionaram-se sete colónias aleatoriamente, e procedeu-se à indução da expressão do antígeno recombinante sintético multiepitopo pelas mesmas, por estimulação com IPTG (do inglês, *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*), um reagente utilizado na biologia molecular para indução da expressão proteica em genes sob controlo do operão *lac* (ver figura 10, pág. 38).

As colónias transformadas foram estimuladas da seguinte forma: em primeiro lugar, a conjuntos de dois tubos *falcon* de 15 mL que continham 4 mL de meio líquido LB com ampicilina, foram adicionados 100 μ L da respetiva cultura celular das bactérias *BL21 Star (DE3)* transformadas com o vetor de expressão. Estes tubos sofreram incubação a 37 °C com agitação orbital (250 rpm), até apresentarem uma absorvância de 0,5 a um comprimento de onda de 600 nm. Terminada a incubação, a um dos tubos foi adicionado IPTG a uma concentração final de 1 mM. O outro tubo serviu de controlo à indução, não se adicionando o indutor. De seguida, ambos os tubos incubaram a 37 °C, em agitação orbital (250 rpm), durante 3 horas.

Após o período de indução, recorreu-se a uma eletroforese de proteínas por SDS-PAGE (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), para verificar o resultado do ensaio de expressão. Para isso, foi feita a recuperação dos sedimentos dos dois tubos *falcon*, através de centrifugação a 5000 g durante 10 minutos. Aos sedimentos foram adicionados 200 μ L de tampão de lise (40 % glicerol, 240 mM Tris-HCl [pH 6,8], 8 % SDS, 0,04 % azul de bromofenol e 5 % beta-mercaptoetanol) e a mistura foi sujeita a um choque térmico a 90 °C, durante 5 minutos, seguida de colocação em gelo.

Os sedimentos foram analisados por SDS-PAGE recorrendo-se ao *Mini-PROTEAN[®] Electrophoresis Cell* da *Biorad[®]* e ao aparelho EC4000P da *Apparatus Corporation[®]*, estando o protocolo detalhado no anexo 6 na pág. 123. Com os resultados, avaliou-se a expressão proteica da cultura celular das bactérias *BL21 Star (DE3)* transformadas com o vetor de expressão, estimuladas e não estimuladas.

Posteriormente, procurou-se otimizar as condições de indução, estudando seis condições de estimulação diferentes, apresentadas no quadro 13.

Quadro 13. Diferentes condições de estimulação utilizadas na otimização do processo de indução da expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo em *E. coli BL21 Star (DE3)* transformadas com o vetor de expressão.

Condições de estimulação da expressão proteica	
0,25 mM de IPTG a 20 °C	18 horas de incubação
0,5 mM de IPTG a 20 °C	
1 mM de IPTG a 20 °C	
0,25 mM de IPTG a 37 °C	
0,5 mM de IPTG a 37 °C	
1 mM de IPTG a 37 °C	

Depois do período de incubação, o produto da lise dos sedimentos das culturas celulares que sofreram diferentes condições de estimulação, foram estudados também por SDS-PAGE recorrendo-se ao aparelho *Mini-PROTEAN® Electrophoresis Cell*, como descrito anteriormente.

2.4.3 Estudo dos produtos da cultura celular quanto à presença de antígeno recombinante sintético multiepítopo após indução

Escolhida a melhor condição de estimulação proteica a utilizar, interessava perceber se o antígeno que estava a ser produzido também era libertado para o exterior das células (sobrenadante) e/ou se as células o mantinham no interior (sedimento). Para isso, a partir de uma cultura celular que sofreu uma prévia indução por IPTG nas condições otimizadas (3 horas a 37 °C), fez-se a recolha e análise do sobrenadante, do conteúdo periplasmático e do sedimento respetivo. Assim, 1 mL de uma cultura estimulada foi centrifugada a 5000 g durante 5 minutos à temperatura ambiente e tanto o sobrenadante como o sedimento foram recuperados e guardados separadamente a -20 °C.

Para se obter o extrato periplasmático, o sedimento obtido no passo anterior teve de ser ressuscitado em 250 µL de TES 1x (0,2 M Tris-HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA; 0,5 M sucrose), seguido da adição de 375 µL de TES 0,2x. Esta suspensão celular sofreu uma homogeneização no *vortex*, com posterior incubação de 30 minutos em gelo. Finda a incubação, foi efetuada uma centrifugação a 5000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo *falcon* de 15 mL, onde ficou armazenado a -20 °C.

Para a obtenção do extrato do sedimento total, um sedimento proveniente da centrifugação da cultura celular inicial, foi ressuspenso em 250 μL de tampão fosfato salino (PBS) 1x (8g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 [1L, pH 7,4]) e posteriormente fervido durante 5 minutos. Após a fervura, centrifugou-se a 5000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi transferido com cuidado para novo tubo *falcon* de 15 mL onde foi armazenado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Estes três produtos, assim como o sobrenadante inicial da cultura celular, recuperado imediatamente antes do início da indução, foram estudados por ELISA, em duplicado, tendo por base o facto de, com o *kit* de expressão utilizado, o antigénio de interesse ser expresso com um resíduo C-terminal de seis histidinas, capaz de ser reconhecido por um anticorpo anti-histidina.

2.4.3.1 Protocolo da técnica de ELISA utilizado na deteção do antigénio recombinante sintético multiepitopo nos diferentes produtos celulares

Numa placa de ELISA *Greiner*[®] com poços transparentes de fundo raso, foram adicionados 50 μL dos quatro produtos da cultura celular que se pretendia analisar (sobrenadante sem estimulação, sobrenadante após estimulação, conteúdo periplasmático e sedimento total após estimulação), em diferentes poços. Estes produtos ficaram a adsorver à placa durante 18 horas a $4\text{ }^\circ\text{C}$. Findo o processo de adsorção, as placas foram lavadas uma vez com PBS 1x e os poços foram bloqueados com 70 μL de PVA a 1 % (do inglês, *Polyvinyl alcohol*) durante 1 hora à temperatura ambiente ($20\text{-}25\text{ }^\circ\text{C}$). Terminado o processo de bloqueio, o PVA a 1 % foi retirado dos poços e adicionou-se o primeiro anticorpo, um anticorpo monoclonal anti-polihistidina produzido em rato (A7058, Sigma[®]), diluído a 1:5000 em PBS com 0,05 % de Tween-20 (PBS-T). Este anticorpo permaneceu em incubação nos poços durante 1 hora a $37\text{ }^\circ\text{C}$, após a qual a placa sofreu três lavagens com PBS-T e uma lavagem com água esterilizada. Posteriormente, fez-se a adição de um segundo anticorpo, uma IgG anti-rato conjugada com fosfatase alcalina e produzida em cabra (A5153, Sigma[®]), diluída a 1:5000 em PBS-T, capaz de reconhecer o primeiro anticorpo. O segundo anticorpo foi incubado de forma semelhante à do primeiro anticorpo e após a incubação, efetuou-se nova lavagem. Por fim, fez-se a revelação dos resultados pela adição de 50 μL do substrato *4-nitrophenylphosphate sodium salt* (Applichem[®]), preparado numa

proporção de 1 mg/mL em tampão de substrato (10 mM etanolamida, 0,5 mM cloreto de magnésio, [pH = 9,6-10]), em cada poço. O substrato ficou em contacto com os poços durante 1 hora à temperatura ambiente, após a qual foi feita uma leitura a 405 nm, no leitor de microplacas *Infinite*[®] 200 *Pro* da *Tecan*[®].

Aos valores de absorvância obtidos para cada produto, foi subtraída a absorvância do poço considerado “branco”. Neste poço, nenhum destes produtos foi adsorvido, no entanto, todo o restante procedimento da técnica de ELISA foi respeitado.

O produto da cultura celular considerado o melhor para obtenção do antigénio recombinante sintético multiepítipo (sedimento total) foi utilizado nos passos seguintes do estudo.

2.5 Purificação do antigénio recombinante sintético multiepítipo de *Pneumocystis jirovecii*

Neste trabalho, a purificação do antigénio recombinante sintético multiepítipo foi efetuada através de uma cromatografia de afinidade IMAC (do inglês, *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*), concebida para purificar proteínas e péptidos que têm afinidade para iões metálicos, tais como proteínas marcadas com histidina. A utilização deste método de purificação segue as recomendações do fabricante do *kit* de expressão utilizado.

2.5.1 Escolha e preparação da resina para purificação por IMAC

Geralmente, os iões metálicos bivalentes/bipositivos, como é o caso do Níquel (Ni^{2+}), são recomendados para a purificação de proteínas ou péptidos marcados com histidina (Block *et al.*, 2009). Em virtude do exposto, para a purificação do antigénio recombinante sintético multiepítipo, foi utilizado o *kit Ni Sepharose*[™] 6 *Fast Flow* da *GE Healthcare*[®].

A realização deste método de purificação depende da utilização de tampões apropriados ao processo de ligação do antigénio à resina e, posteriormente, à eluição do mesmo. Assim, as condições de recuperação do antigénio recombinante sintético multiepítipo foram efetuadas de acordo com as indicações do fabricante do *kit* utilizado e quatro tampões de diferentes propriedades foram utilizados (quadro 14)

Quadro 14. Composição química e função dos diferentes tampões a utilizar no processo de purificação do antigénio recombinante sintético multiepítipo por IMAC com o *kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow*.

Tampão	Composição química	Função
Tampão de Ligação	20 mM de Fosfato de Sódio; 0,5 mM de Cloreto de Sódio; 20 mM de Imidazole; pH 7,4	Ligação do antigénio recombinante sintético multiepítipo à resina
Tampão de Eluição	20 mM de Fosfato de Sódio; 0,5 mM de Cloreto de Sódio; 500 mM de Imidazole; pH 7,4	Eluição do péptido recombinante sintético previamente ligado ao níquel presente na coluna
Tampão de Remoção de Níquel	20 mM de Fosfato de Sódio; 0,5 mM de Cloreto de Sódio; 50 mM de EDTA; pH 7,4	Remoção dos iões Ni ²⁺ da resina, assim como de todas as moléculas a eles ligadas
Tampão de Regeneração da Resina	0,1 M de Sulfato de Níquel	Reintrodução dos iões Ni ²⁺ na resina

Inicialmente, o frasco proveniente do fabricante (*GE Healthcare*[®]) foi agitado por forma a se homogeneizar a resina. Posteriormente, transferiram-se 2 mL dessa resina para um tubo *falcon* de 15 mL que sofreu uma centrifugação a 5000 g durante 5 minutos, tendo-se sedimentado a resina a utilizar. O sobrenadante, constituído por etanol a 20 %, foi descartado e substituído por 5 mL de água destilada desionizada. A resina e a água ficaram em homogeneização por agitação orbital durante 3 minutos, após os quais se voltou a sedimentar a resina nas condições de centrifugação atrás descritas. De seguida, após remoção do sobrenadante, foi feita nova homogeneização do meio, agora em 5 mL de tampão de ligação, nas mesmas condições, terminando com a sedimentação da resina por nova centrifugação. Fez-se novamente a remoção do sobrenadante e, com a ajuda de uma proveta, constituiu-se uma solução de 50 % de resina *Ni sepharose 6 Fast Flow* em volume adequado de tampão de ligação.

Após preparação da resina, foi necessário proceder à preparação da coluna de purificação. Neste estudo, foi utilizada uma mini coluna *polyprep* da *Biorad*[®], cujo filtro sofreu prévia lavagem com 20 % de etanol, seguida de uma lavagem com água destilada estéril. A colocação da resina na coluna de purificação permitiu proceder à adição da amostra, funcionando como um suporte sólido de acomodação da resina para a cromatografia de afinidade IMAC.

2.5.2 Preparação da amostra para realização da purificação do antigénio recombinante sintético multiepítopo por IMAC

A amostra deve ser previamente preparada por forma a se realizar uma lise celular da cultura bacteriana, em condições ótimas. Para averiguar qual o melhor método de lise celular a ser aplicado, fez-se o estudo de três técnicas diferentes, com recurso a dois tampões de lise com agentes distintos. Um dos tampões de lise era composto por 20 mM de fosfato de sódio, 1 mM de ditioneitol (DTT), 20 mM de Imidazole, 0,1 mM de PMSF, 0,5 M de cloreto de sódio, 0,2 % de Triton X-100 e 0,2 mg/mL de lisozima em pH 7,4. O outro tampão de lise utilizado no processo de otimização era semelhante ao primeiro, com a exceção do agente enzimático lisozima, que não fazia parte da sua constituição. No processo de otimização, o sedimento resultante da cultura de 15 mL de *E. coli BL21 Star (DE3)* estimuladas para produzir o antigénio recombinante, foi ressuscitado em 6 mL de um tampão de lise. Deixou-se atuar o tampão durante 10 minutos e efetuou-se a divisão da suspensão obtida para três tubos *ependorfs* diferentes, ficando cada um com 2 mL da suspensão.

Um dos tubos possuía 0,3 g de partículas de zircónio com 0,5 mm de diâmetro (*BIOSPEC Products*[®]) e foi aplicado no aparelho *Mini beadbeater-8 (BIOSPEC Products*[®] - HowawrdTH Industries) onde a sua suspensão sofreu 2800 oscilações/minuto durante 2 minutos, seguida de incubação em gelo durante 5 minutos. Terminado o processo de lise, realizou-se uma centrifugação a 15700 g durante 5 minutos e o sobrenadante foi guardado a -20 °C para posterior análise.

O segundo *ependorf* sofreu 6 ciclos de 30 segundos de sonicação por sonda de ultrassons (*Bandelin Sonopuls HD 2070*) a um impulso de 10 % numa potência entre os 75 e os 80 %, findos os quais se seguiu uma centrifugação a 15700 g durante 5 minutos que permitiu guardar o sobrenadante para posterior análise.

O terceiro *ependorf* foi sujeito a um choque térmico, tendo sofrido três ciclos de fervura durante 5 minutos, seguidos de arrefecimento em gelo. Terminados estes ciclos, o sobrenadante foi recuperado da mesma forma que nos *ependorfs* anteriores, guardando-se para posterior análise.

Tendo-se obtido todos os sobrenadantes para estudo, efetuou-se uma avaliação da presença do antigénio recombinante sintético multiepítopo em cada um deles, em duplicado, pela técnica de ELISA enunciada na secção 2.4.3.1. O método de lise

considerado ótimo (choque térmico com tampão de lise sem o agente enzimático) foi aplicado, neste estudo, na obtenção da amostra a utilizar na coluna preparada com a resina de purificação.

2.5.3 Procedimento de purificação do antígeno recombinante sintético multiepitopo por IMAC

O procedimento de purificação foi adaptado das recomendações do fabricante do kit da resina *Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* da *GE Healthcare®*, tendo sofrido ligeiros ajustes provenientes de uma otimização da técnica, com o objetivo de se obter a maior quantidade de antígeno recombinante purificado possível.

Procedimento de purificação: a amostra foi adicionada à coluna numa razão de 6 mL de amostra para 1 mL de resina a 50 %. Após a adição da amostra, a coluna sofreu agitação orbital durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois desta incubação, fez-se a eluição das moléculas que não se ligaram à resina, recolhendo-se o material para um primeiro tubo *falcon* de 15 mL. De seguida, fez-se a lavagem da resina, onde se adicionou, por três vezes consecutivas, 1 mL de tampão de ligação, fazendo-se a recuperação dos eluídos para outro tubo *falcon* de 15 mL diferente. A eluição do antígeno a purificar, que se encontrava ligado à resina, foi o passo que se seguiu. Esta eluição foi feita através da adição, por oito vezes consecutivas, de 0,5 mL de tampão de eluição, e os produtos recuperados para oito tubos *ependorf* distintos. Por fim, foi feita uma eluição dos íões níquel da resina assim como de todas as moléculas a eles ligadas, pela adição por quatro vezes consecutivas de 0,5 mL do tampão de remoção do níquel, tendo os produtos sido recuperados noutros quatro *ependorfs*.

Terminado o procedimento de purificação, os diferentes produtos foram analisados por leitura a 280 nm no equipamento *Nanodrop 1000* da *Thermo Scientific®* e por SDS-PAGE (ver anexo 6, pág. 123), para avaliação do conteúdo das eluições. As eluições que apresentaram o antígeno recombinante purificado foram juntas, para obtenção de uma única solução concentrada desse antígeno.

2.6 Caracterização da amostragem

Para o estudo da utilidade do antígeno recombinante sintético multiepitopo produzido para o diagnóstico serológico da PPc, a população escolhida envolveu

97 indivíduos. Desta população, 80 indivíduos tinham suspeita de PPc, tendo os seus produtos biológicos de secreções pulmonares e sangue sido enviados, entre 2010 e 2013, para o laboratório do Grupo de Protozoários Oportunistas/VIH e Outros Protozoários da unidade de Parasitologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), da Universidade Nova de Lisboa (UNL), para a realização do diagnóstico laboratorial de PPc. Os restantes 17 indivíduos eram dadores de sangue, constituindo o grupo controlo.

Dos 80 doentes com suspeita de PPc, as amostras biológicas de secreções pulmonares recebidas e analisadas dividiram-se em 13 expetorações induzidas (EI) e 67 lavados broncoalveolares (LBA), todas elas com a respetiva amostra de sangue. Os produtos biológicos eram provenientes de hospitais da região de Lisboa e eram acompanhados da respetiva informação clínica.

2.6.1 Processamento dos produtos biológicos

Ao darem entrada no laboratório, as amostras de secreções pulmonares (EI e LBA) e de sangue, foram imediatamente identificadas, catalogadas e processadas, tendo o material biológico sido concentrado e dividido para procedimentos de diagnóstico e posteriores estudos. Todo o processamento das amostras foi efetuado numa *hotte* química e com recurso a material esterilizado. Os protocolos de processamento, para os dois tipos de amostra pulmonar e para a amostra de sangue, encontram-se descritos no anexo 7 na pág. 125.

2.6.2 Detecção de *Pneumocystis jirovecii* em espécimes pulmonares por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM)

A técnica de deteção de *P. jirovecii* por IFI/AcM é considerada como a referência para o diagnóstico da PPc, em amostras de secreções pulmonares, pois é bastante fiável e sensível na deteção de quistos deste microrganismo (Lautenschlager *et al.*, 1996; Bava, Cattáneo & Bellegarde, 2002). Para este efeito foi utilizado o protocolo comercial *MonoFluo*[®] *Kit P. jirovecii* da *BioRad*[®] e a técnica foi executada com base nas instruções do fabricante, encontrando-se o protocolo detalhado no anexo 8 na pág. 129. Além do diagnóstico qualitativo, as amostras deste estudo foram também classificadas quanto à carga parasitária que apresentavam. Deste modo, procedeu-se à

semi-quantificação do número de quistos observados nos esfregaços segundo os critérios descritos no quadro 15.

Quadro 15. Critérios de semi-quantificação da carga parasitária das amostras de secreções pulmonares analisadas pela técnica de IFI/AcM.

Carga parasitária	Número de quistos de <i>P. jirovecii</i> detetados por IFI/AcM (x1000)
Baixa	Zero quistos em 30 campos Positivo por PCR- <i>nested</i>
Moderada	Um a trinta quistos em 30 campos
Elevada	Dois ou mais quistos por campo

2.6.3 Detecção de *Pneumocystis jirovecii* em espécimes pulmonares por PCR-*nested*

O diagnóstico molecular é justificado quando amostras de espécimes pulmonares, sobre as quais existe suspeita clínica da presença do microrganismo *P. jirovecii*, apresentam resultado negativo na técnica IFI/AcM.

No presente estudo, o diagnóstico molecular de *P. jirovecii* consistiu na amplificação e deteção de um segmento de DNA específico (gene que codifica para a subunidade grande do ribossoma mitocondrial, *mtLSUrRNA*), através da técnica de PCR-*nested*, descrita anteriormente (Wakefield *et al.*, 1990), após extração de DNA genómico do microrganismo. Os protocolos referentes a este método de deteção encontram-se detalhados no anexo 9 e 10 (págs. 129 e 131).

2.6.4 Processamento da informação clínica

A informação clínica analisada neste estudo consistiu na recolha de dados relativos à idade, sexo, imunodeficiência, contagem de células T CD4⁺, diagnóstico clínico e definitivo de cada indivíduo. Toda a informação cedida para a realização deste estudo foi aprovada pelos concelhos de ética das instituições envolvidas.

A idade dos indivíduos foi catalogada em seis grupos etários diferentes: [0-4]; [5-9]; [10-19]; [20-29]; [30-39]; ≥ 40.

A origem da imunodeficiência dos doentes foi distribuída por seis categorias diferentes: VIH+, transplantados, oncológicos, recém-nascidos, outras causas e sem imunodeficiência.

Outro fator importante que se teve em conta na informação clínica foi a contagem de células T CD4⁺, tendo-se considerados três grupos de risco para doença oportunista: grupo de baixo risco com contagem de T CD4⁺ superior a 200 células/mm³; grupo de alto risco com contagem de T CD4⁺ entre as 50 e as 200 células/mm³; grupo de muito alto risco com contagem de de T CD4⁺ inferior a 50 células/mm³.

O diagnóstico clínico da PPc consistiu na presença de, pelo menos, duas das seguintes variáveis: sintomas como tosse não produtiva, febre e dispneia; raio-x do tórax sugestivo (imagem do infiltrado intersticial bilateral); PaO₂ inferior a 65 mmHg.

Um episódio de PPc foi definido como um caso com quadro clínico sugestivo de PPc, com *P. jirovecii* identificado por técnicas parasitológicas (IFI/AcM), ou pela deteção do DNA de *P. jirovecii* por PCR-*nested*, nos espécimes pulmonares. Infecção subclínica (colonização) por *P. jirovecii* foi definida em doentes com reduzida carga parasitária, onde *P. jirovecii* é identificado, apenas, por PCR-*nested*, nos espécimes pulmonares, sem o suporte do diagnóstico clínico de PPc.

2.7 Aplicação do antígeno recombinante sintético multiepítipo no desenvolvimento de um teste ELISA para deteção de anticorpos totais, IgG e IgM anti-*Pneumocystis jirovecii*

Neste estudo, pretendeu-se desenvolver um método de ELISA que fosse capaz de fazer a discriminação entre indivíduos com pneumocistose ativa e indivíduos saudáveis (dadores) e/ou portadores assintomáticos e/ou doentes com outras patologias pulmonares. Para isso, estudou-se os níveis de anticorpos totais e das frações IgM e IgG, contra o antígeno recombinante purificado, em amostras de soro de quatro categorias de indivíduos: diagnosticados com pneumocistose ativa (PPc); portadores de *P. jirovecii* mas sem pneumocistose (colonizados); sem *P. jirovecii* mas com outras patologias pulmonares (não PPc); dadores de sangue.

Para otimização da técnica de imunodeteção por ELISA de anticorpos contra o antígeno recombinante purificado, inicialmente, estudaram-se duas amostras. Uma das amostras consistia numa *pool* de soros de indivíduos onde foi detetada a presença de *P. jirovecii*, a outra amostra correspondia a uma *pool* de soros de indivíduos sem *P. jirovecii*. Cada uma destas *pools* foi constituída por cinco amostras de referência,

especificamente caracterizadas como positivas ou negativas para *P. jirovecii*, respetivamente.

A reatividade das duas *pools* foi estudada em diluições seriadas 1:10, em tampão PBS-T com 5 % de albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*), até à diluição 1:20480. A reatividade de uma amostra de PBS 1x (controlo negativo) foi também testada, sendo o seu valor subtraído ao valor da reatividade das *pools*.

Estas amostras foram testadas contra os produtos purificados de antigénio recombinante sintético multiepítipo (ver secção 2.5.3, pág. 49). Dos produtos provenientes do processo de purificação (IMAC), somente os primeiros seis eluídos com o tampão de eluição foram utilizados. Estes eluídos foram diluídos em bicarbonato de sódio (H_2CO_3 , 50 mM [pH 8,4]) até se obter uma concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antigénio, calculada através de uma curva de calibração da proteína BSA, e confirmada por leitura no aparelho *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific®)*.

Diferentes tempos e temperaturas de incubação foram testados tendo-se, após análise dos resultados, selecionado a diluição preferencial a utilizar (1:80), assim como as condições ideais de incubação (1 hora a 37 °C).

2.7.1 Protocolo do teste ELISA desenvolvido para avaliação da produção diferencial de anticorpos por parte dos diferentes grupos de indivíduos

Numa placa ELISA *Greiner®* com poços transparentes de fundo raso, a todos os poços correspondentes às colunas 1, 3, 5, 7, 9 e 11, adicionaram-se 50 μL do antigénio recombinante purificado (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O antigénio sintético ficou a adsorver à placa durante 18 horas a 4 °C, tendo-se, de seguida, lavado a placa, uma única vez, com solução salina PBS 1x. Seguiu-se o bloqueio de todos os poços da placa com 70 μL de PVA a 1 %, que ficou a incubar nos poços durante 1 hora à temperatura ambiente (20-25 °C). Após o bloqueio, o PVA a 1 % foi retirado dos poços, sem se proceder a qualquer lavagem. Seguiu-se a adição de 50 μL dos soros dos indivíduos em estudo, diluídos 1:80 em PBS-T com BSA (PBS-T+BSA), onde podiam estar presentes anticorpos contra o antigénio recombinante sintético multiepítipo. Estes soros foram adicionados em duplicado, para que o mesmo soro fosse avaliado num poço onde foi feita a adsorção do antigénio e noutro poço onde o antigénio não foi adsorvido (controlo). Estes soros permaneceram em incubação durante 1 hora a 37 °C, após a qual

a placa sofreu três lavagens com PBS-T e uma quarta lavagem com água destilada. Posteriormente, foi feita a adição do conjugado. Dependendo do que se desejava estudar, foi adicionado a cada poço 50 µL de um conjugado correspondente a um anticorpo anti-imunoglobulina humana produzido em cabra (A3813, Sigma[®]), diluído a 1:10000 em PBS-T+BSA, ou a adição de um anticorpo anti-imunoglobulina M humana produzido em cabra (2020-04, *Southern Biotech*[®]) e diluído a 1:3000 em PBS-T+BSA, ou a adição de um anticorpo anti-imunoglobulina G humana produzido em cabra (2040-04, *Southern Biotech*[®]) diluído a 1:3000 em PBS-T+BSA. Estes segundos anticorpos encontravam-se todos conjugados a uma enzima, a fosfatase alcalina. Incubou-se a placa durante 1 hora a 37 °C, após a qual se repetiu o processo de lavagem utilizado para os soros. Por fim, fez-se a revelação dos resultados pela adição de 50 µL do substrato *4-nitrophenylphosphate sodium salt* (10 mg/mL, *Appllichem*[®]) em cada poço. Efetuou-se uma incubação de 1 hora a 37 °C, durante a qual o substrato entrou em contacto com a enzima presente nos conjugados, dando origem a uma solução amarelada. A leitura da placa foi efetuada a 405 nm, no leitor de microplacas *Infinite*[®] *200 Pro* da Tecan[®].

2.8 Análise dos dados

A análise dos dados obtidos permitiu avaliar a fiabilidade do teste ELISA desenvolvido, utilizando medidas estatísticas como a sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e ainda a curva ROC (do inglês, *Receiver Operator Curve*). Utilizou-se o teste do chi-quadrado (χ^2) e o Teste Exato de *Fisher* para estudar a associação entre duas variáveis qualitativas. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para determinar a diferença entre a distribuição dos valores das leituras ELISA para os diferentes anticorpos utilizados, quando comparadas duas categorias de indivíduos, e o teste *Kruskal-Wallis* substituiu o teste de *Mann-Whitney* quando foram comparadas mais que duas categorias de indivíduos. Os testes estatísticos foram aplicados com um grau de confiança de 95 %, ou seja, considerou-se que um teste era estatisticamente significativo quando o seu p era igual ou inferior a 0,05.

Foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para realizar os diferentes testes estatísticos (Esteves *et al.*, 2014a).

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1 Produção do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *Pneumocystis jirovecii*

Após uma análise bibliográfica que conduziu à escolha da fração MsgC da Msg de *P. jirovecii* como produto a sintetizar, fez-se a confirmação da presença da sequência nucleotídica dessa fração em duas sequências molde de DNA de *P. jirovecii*, escolhidas aleatoriamente de amostras caracterizadas como PPc positivas na população portuguesa. O resultado da reação de PCR *LongRange* pode ser observado na figura 11.

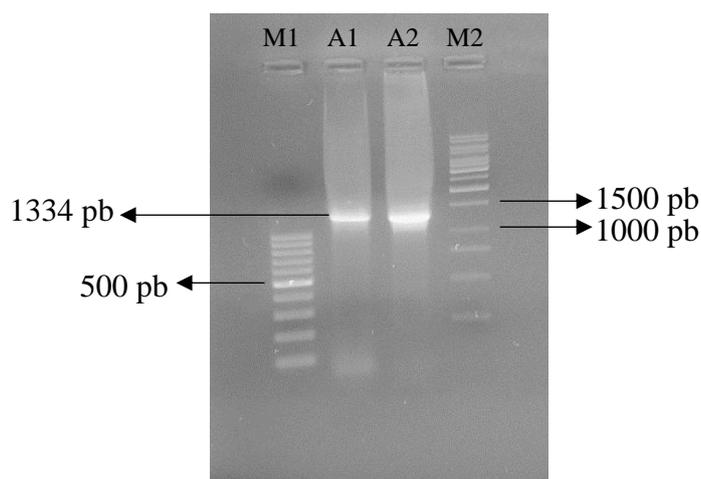


Figura 11. Fotografia do gel de agarose resultante da eletroforese dos produtos da PCR *LongRange*, com revelação dos produtos finais das duas amostras estudadas (A1 e A2) e dos marcadores de 100 pb (M1) e 1000 pb (M2).

Com a obtenção da banda esperada, correspondente a 1334 pb, confirmou-se a presença da região de interesse no DNA de *P. jirovecii* em amostras de doentes da população que se pretendia estudar, tendo-se conferido, por sequenciação e alinhamento, a semelhança desta sequência com a descrita na base de dados do NCBI para a Msg de *P. jirovecii* (*GenBank*: JN792933.1) (figura 12). Comprovada a semelhança, fez-se ainda um *blast* da sequência originada na PCR *LongRange* e foi encontrada correspondência, na casa dos 90 %, com outras sequências da Msg de *P. jirovecii*, depositadas na base de dados do NCBI.

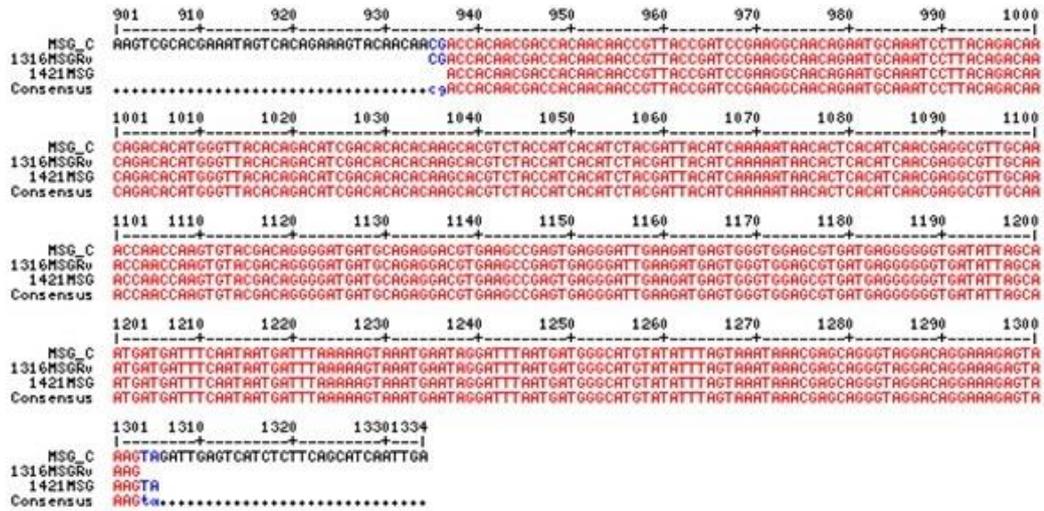


Figura 12. Resultado do alinhamento da sequenciação dos fragmentos obtidos na PCR *LongRange* (1316MSGRv, 1421MSG) com a sequência nucleotídica (*GenBank*: JN792933.1) da região *MsgC* descrita na base de dados do NCBI (*MSG_C*). Representação a encarnando dos nucleótidos semelhantes entre as sequências.

De seguida, fez-se a análise de uma sequência de 582 aminoácidos correspondente à porção final da fração *MsgB* e de toda a fração *MsgC* de *P. jirovecii*, onde foi analisado o perfil de hidrofobicidade e a posição putativa relativamente à membrana citoplasmática destes aminoácidos. Na análise das características de hidrofobicidade, foi utilizada a escala de *Kyle & Doolittle* e foi obtido o perfil representado na figura 13a. Para avaliar a posição desta sequência de aminoácidos relativamente à membrana de *P. jirovecii*, recorreu-se ao *software* online *CBS – TMHMM* – versão 2.0, onde se obteve uma probabilidade próxima de 1 para uma exposição externa relativamente à membrana, ao longo de toda a região analisada. Em virtude do exposto, partiu-se para uma análise parcelar das regiões com maiores picos de hidrofilia (valores mais negativos da escala) e foi feita uma seleção final de três dessas regiões. O perfil de hidrofobicidade das três regiões selecionadas está ilustrado na figura 13b.

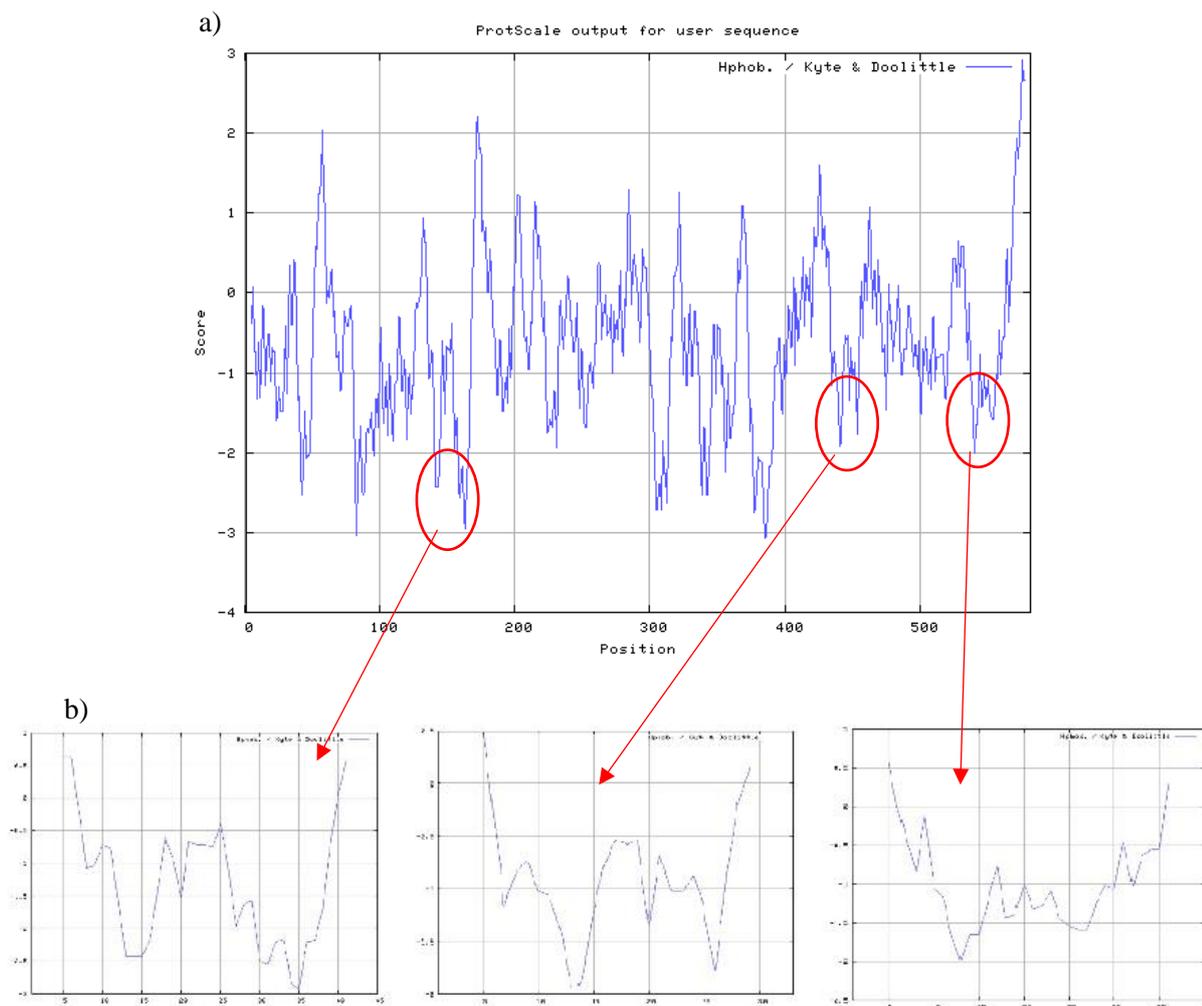


Figura 13. Esquema representativo da posição das três regiões selecionadas na sequência de aminoácidos da fração MsgC de *P. jirovecii*, segundo a escala de *Kyle & Doolittle* [a)] e dos seus perfis de hidrofobicidade individuais, segundo a mesma escala [b)].

Feita a seleção, foi desenhado um péptido composto pelas três regiões de interesse ligadas entre si por pontes de cinco resíduos de glicina. Este péptido recombinante foi posteriormente sintetizado com sucesso (*Nzytecn*[®]), num vetor otimizado para expressão em *E. coli*, o vetor pUC57-Amp. De seguida, o péptido multiepítopo correspondente ao antigénio recombinante sintético foi clonado com sucesso no vetor de expressão pLATE31, que permitiu a sua produção com uma cauda C-terminal adicional de seis resíduos histidina. Assim, a composição nucleotídica final do antigénio recombinante sintético multiepítopo produzido neste estudo pode ser analisada no quadro 16.

Quadro 16. Composição em aminoácidos do antígeno recombinante sintético multiepítipo.

Sequência de aminoácidos do antígeno recombinante sintético multiepítipo
GTTEILKQVLLNEHKDTLKDQESC.VKYLKEKCNKWSRRGNDRFSLVCFLEGGGGGVAEVFGRY VGLKERCNKLESDCGIKEDCKDLEGVCGKIQGGGGTSTITTSKITLTSTRCKPTKCTTGDDAE DVKPSEGLKMSGWSVMRGHHHHHH

Por fim, recorreu-se à ferramenta *online ExPASy – ProtParam* onde foi possível determinar vários parâmetros físico-químicos do antígeno recombinante sintético multiepítipo, detalhados no quadro 17.

Quadro 17. Discriminação de parâmetros físico-químicos do antígeno recombinante multiepítipo sintetizado.

Número de aminoácidos	152
Peso molecular	16,7 kDa
Ponto isoelétrico teórico	8,57
Tempo estimado de meia-vida em <i>E. coli</i>	> 10 horas
Índice de instabilidade	38,39 (stable)
Índice de hidropaticidade	-0,702

3.2 Clonagem do antígeno recombinante sintético multiepítipo em *E. coli* TOP10

O vetor pUC57-Amp com a região codificante do antígeno recombinante sintético multiepítipo foi clonado com sucesso em *E. coli* TOP10, tornadas competentes pelo método do cloreto de sódio. Para a transformação bacteriana, foi utilizado o método do choque térmico, tendo-se avaliado a eficiência da transformação bacteriana em quatro tempos diferentes de exposição a 42 °C (2, 3, 4, e 5 minutos). Os resultados obtidos após a cultura das células transformadas em meio sólido LB com ampicilina estão representados na figura 14, à exceção da placa controlo, correspondente à cultura de *E. coli* TOP10 não transformadas, que não apresentou qualquer tipo de crescimento celular.

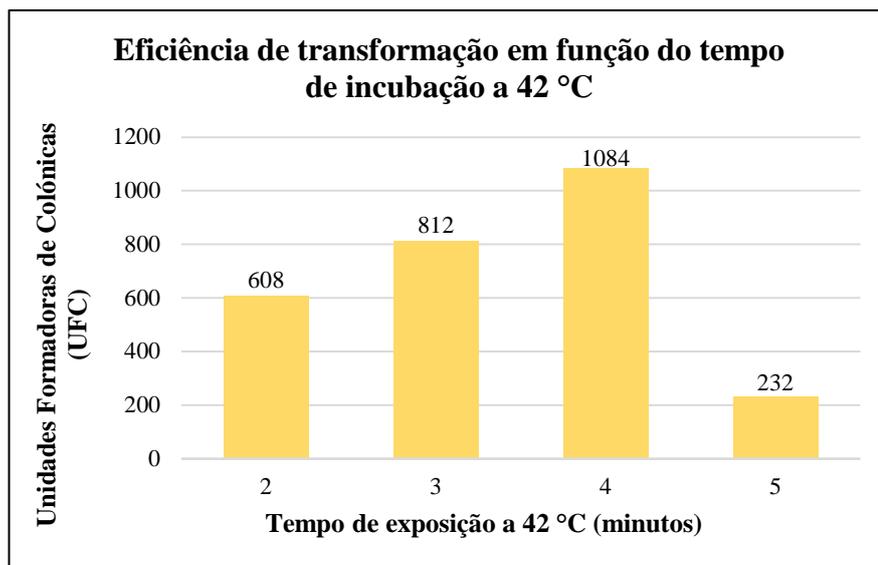


Figura 14. Gráfico demonstrativo do número de UFC em função da duração do choque térmico a 42 °C.

Tendo em conta os resultados obtidos, apurou-se que o tempo ideal de exposição para a estirpe e vetor utilizados estava nos 4 minutos. A não ocorrência de crescimento bacteriano na placa controlo vem validar a técnica de transformação.

A partir de colónias isoladas das células transformadas, foram feitos 61 isolamentos em placas de *petri* contendo meio LB com ampicilina, de modo a se manter a viabilidade das mesmas.

Terminado o processo de transformação das bactérias, interessava confirmar a presença do fragmento de interesse correspondente à sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo no seu DNA. Assim, das 61 colónias isoladas, seleccionaram-se aleatoriamente duas, que foram testadas, juntamente com o vetor puro, em duplicado, por PCR. O gel com os resultados desta PCR está representado na figura 15. A composição nucleotídica das bandas de interesse foi obtida por sequenciação e está representada no quadro 18. O seu conteúdo foi alinhado com a sequência teórica do antígeno recombinante sintético multiepítipo e o resultado do alinhamento permitiu confirmar a presença da sequência nucleotídica correspondente ao antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor pUC57-Amp e nas bactérias *TOP10* transformadas.

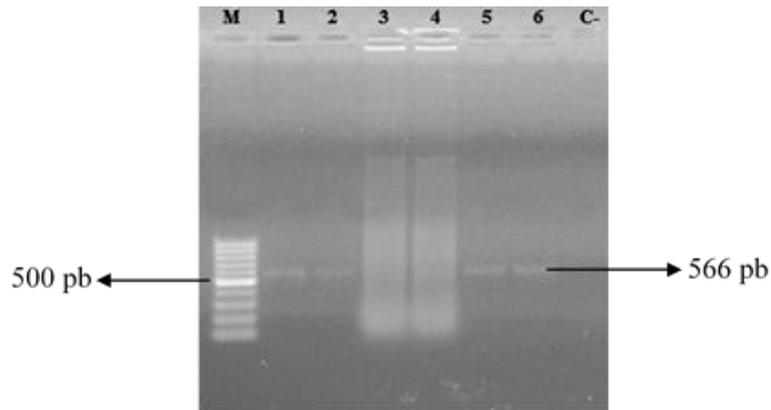


Figura 15. Fotografia dos produtos de PCR do vetor puro (1-2), das colônias (3-6) e do controle negativo (C-) em gel de agarose, após eletroforese. Representação do marcador de peso molecular 100 pb (M). Presença de bandas de 566 pb (nos poços 1, 2, 5 e 6) correspondentes à amplificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo em colônias transformadas.

Quadro 18. Sequência nucleotídica das bandas excisadas do gel de agarose, correspondentes aos produtos de amplificação da reação de PCR do vetor pUC57-Amp puro e da colônia de *E. coli TOP10* transformada. Representação da sequência nucleotídica correspondente ao antígeno recombinante sintético multiepítipo a sombreado mais escuro.

Produto da sequenciação das bandas

```
TGTAAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATGGCAC
CACCGAAATCCTGAAACAAGTCCTGCTGAATGAACATAAAGATAACCCTGAAAGACCAAG
AATCGTGTGTGAAATACCTGAAGGAAAAATGCAACAAGTGGAGTCGTCGCGGCAATGAT
CGTTTTTCCCTGGTGTGTGTTTTCTGGAAGGCGGTGGCGGTGGCGTTCGCGGAAGTGTT
TGGCCGTTATGTTGGTCTGAAAGAACGCTGCAACAAGCTGGAAAGCGACTGCGGTATTA
AAGAAGATTGTAAGGACCTGGAAGGCGTCTGTGGTAAAATTCAGGGCGGCGGCGGCGGC
ACCAGCACCATTACCTCTAAAATCACGCTGACCAGCACGCGTCGCTGCAAACCGACCAA
GTGTACCACGGGCGATGACGCTGAAGATGTCAAGCCGTCTGAAGGTCTGAAAATGAGTG
GTTGGTCCGTGATGCGTGGCATCGGATCCCGGGCCCGTTCGACTGCAGAGGCCTGCATGC
AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTG
```

3.3 Inserção do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão

Por forma a se inserir a sequência do antígeno recombinante sintético multiepítipo no vetor de expressão pLATE31, quatro *minipreps* com DNA plasmídico de *E. coli TOP10* transformadas com o vetor de clonagem foram selecionadas aleatoriamente, para execução de uma PCR, em duplicado, com recurso a *primers* específicos (ver quadro 9, pág. 39), capazes de gerar produtos de amplificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo com extremidades complementares às do

vetor. O gel de eletroforese com os resultados desta reação de PCR está representado na figura 16.

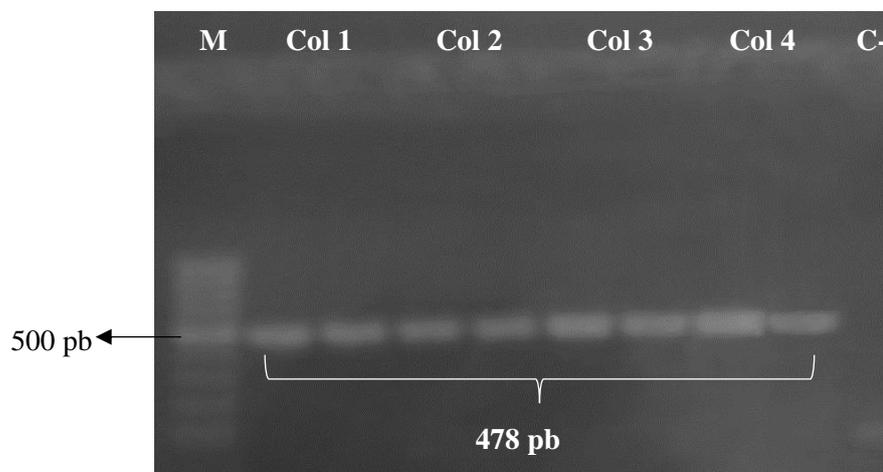


Figura 16. Fotografia dos produtos da PCR de DNA plasmídico de quatro colônias de *E. coli* TOP10 transformadas com o vetor pUC57-Amp (Col 1, Col 2, Col 3 e Col 4) e do controle negativo (C-) em gel de agarose após eletroforese. Representação do marcador de peso molecular 100 pb (M). Presença de bandas de 478 pb em todos os produtos de PCR das bactérias estudadas.

Na figura 16, pode-se comprovar que não houve amplificação do controle negativo, o que valida a técnica. Por outro lado, é observável a presença de bandas com tamanho correspondente ao esperado para o amplicão em todas as colônias analisadas. Assim, para se confirmar que estas bandas correspondiam ao antígeno recombinante sintético multiepítipo acrescido de extremidades complementares às do vetor, fez-se a sequenciação das mesmas. O resultado da sequenciação está presente no quadro 19.

Quadro 19. Resultado da sequenciação das bandas com tamanho correspondente à amplificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo com extremidades complementares às do vetor. Representação das extremidades complementares às do vetor, fornecidas pelos *primers* utilizados na reação de PCR, a sombreado.

Sequencia nucleotídica das bandas amplificadas

```

AGAAGGAGATATAACTATGGGCACCACCGAAATCCTGAAACAAGTCCTGCTGAATGAACATAAAGAT
ACCCTGAAAGACCAAGAATCGTGTGTGAAATACCTGAAGGAAAAATGCAACAAGTGGAGTCGTCGCG
GCAATGATCGTTTTTCCCTGGTGTGTGTTTTCTGGAAGGCGGTGGCGGTGGCGTCGCGGAAGTGTT
TGGCCGTTATGTTGGTCTGAAAGAACGCTGCAACAAGCTGGAAAGCGACTGCGGTATTAAGAAGAT
TGTAAGGACCTGGAAGGCGTCTGTGGTAAAAATTCAGGGCGGCGGGCGGCACCAGCACCATTACCT
CTAAAATCACGCTGACCAGCACGCTCGCTGCAAACCGACCAAGTGTACCACGGGCGATGACGCTGA
AGATGTCAAGCCGTCTGAAGGTCTGAAAATGAGTGGTTGGTCCGTGATGCGTGGCGGCCATCACCAT
CACCACCAC
    
```

De seguida, fez-se uso da DNA T4 polimerase, para criação de extremidades 3' e 5' complementares às do vetor de expressão, no fragmento a inserir no vetor de expressão. Esta enzima tem duas atividades enzimáticas: é uma polimerase no sentido 5'-3' e uma exonuclease no sentido 3'-5'. Com a sua atividade de exonuclease, esta enzima removeu os nucleótidos da extremidade 3' da cadeia de DNA do gene de interesse, enquanto a sua atividade de polimerase foi capaz de restaurar a cadeia com o recurso a dNTPs e à cadeia complementar como molde. Como no protocolo LIC somente foi fornecida à mistura de reação nucleósidos de guanina (dGTPs), a atividade exonuclease 3'-5' equilibrou-se com a atividade 5'-3' polimerase, aquando da presença do primeiro resíduo de citosina na cadeia complementar como ilustrado na figura 17.

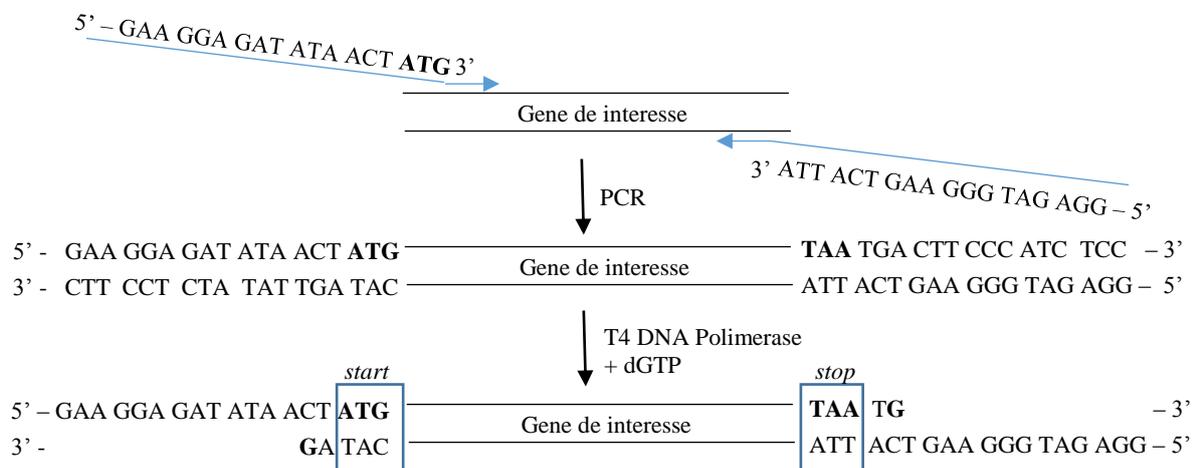


Figura 17. Esquema ilustrativo da produção de extremidades complementares às do vetor de expressão no gene de interesse, por a ação da DNA T4 polimerase.

Após a síntese das extremidades complementares ao vetor de expressão no fragmento a inserir, este foi reconhecido e integrado no vetor de expressão por complementaridade das suas cadeias. Após o reconhecimento, o vetor transformou *E. coli TOP10* e *INVα* competentes e as células transformadas foram semeadas em meio sólido LB com ampicilina em diferentes volumes, estando o número de UFC por volume semeado, representado na figura 18.

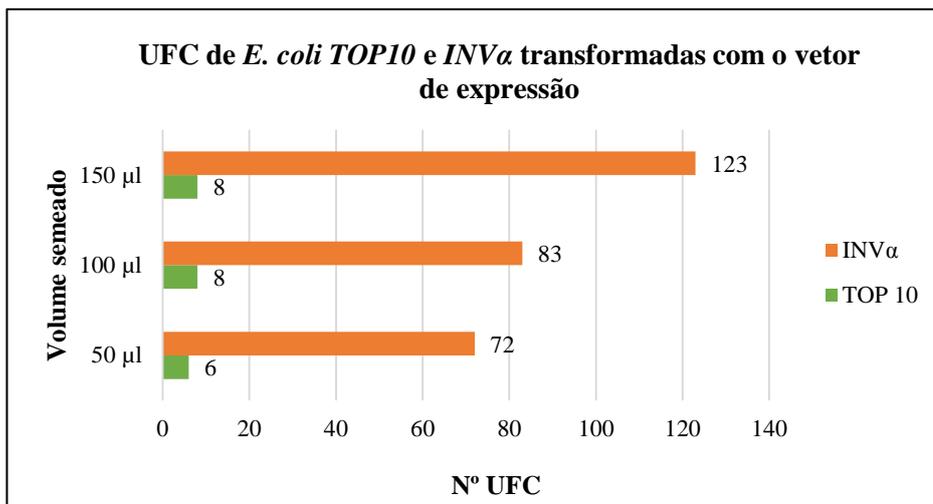


Figura 18. Gráfico representativo do número de UFC de *E. coli* TOP10 e *INVα* transformadas com o vetor de expressão em função do volume de inóculo semeado em meio sólido LB com ampicilina.

Foi também efetuada uma cultura controlo de ambas as estirpes bacterianas, onde se semearam bactérias *INVα* e *TOP10* não transformadas com o vetor de expressão, não se tendo verificado crescimento em qualquer uma destas placas, validando o procedimento.

Como se pode ver na figura 18, as bactérias *INVα* apresentaram maior eficiência de transformação, pelo que, posteriormente, se fez o isolamento da totalidade das colónias das bactérias *TOP10* (n = 22) e de cerca de 20 % das bactérias *INVα* transformadas (n = 60), selecionadas de forma aleatória. Duas colónias de cada estirpe bacteriana, selecionadas aleatoriamente, foram testadas por PCR por forma a se verificar a amplificação de bandas correspondentes à sequência do antigénio recombinante sintético multiepítipo, estando os produtos de amplificação apresentados na figura 19.

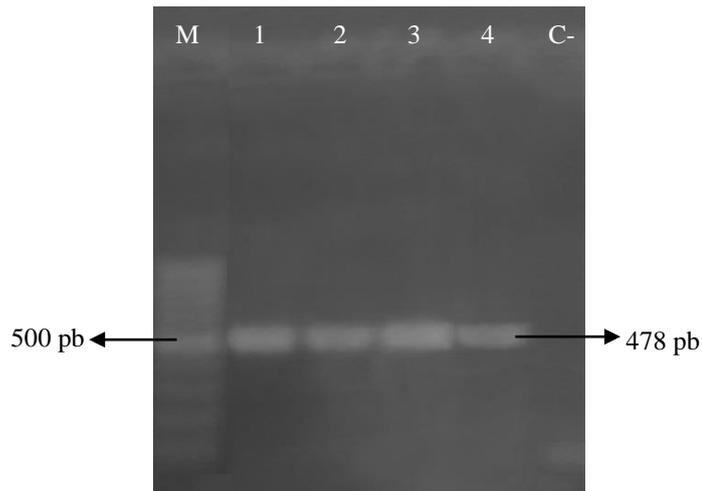


Figura 19. Fotografia dos produtos de PCR de DNA plasmídico de duas colónias de *E. coli* TOP10 (1, 2), de duas colónias de *E. coli* INV α (3, 4), transformadas com o vetor de expressão, e do controlo negativo (C-) em gel de agarose após eletroforese. Representação do marcador de pesos moleculares de 100 pb (M). Presença de bandas de 478 pb em todos os produtos de PCR das colónias estudadas.

As bandas com tamanho correspondente ao esperado foram excisadas do gel, purificadas e estudadas por sequenciação, tendo-se confirmado a presença da sequência nucleotídica do antígeno recombinante sintético multiepítopo nos produtos de PCR, após sequenciação.

3.4 Expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo

Para a expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo, o vetor de expressão pLATE31 foi clonado em *E. coli* BL21 Star (DE3) com sucesso. A confirmação da transformação foi feita por PCR em duas colónias transformadas, escolhidas aleatoriamente de entre as 102 isoladas. Obtiveram-se duas bandas de tamanho esperado (478 pb) e fez-se a subsequente sequenciação das mesmas, tendo-se confirmado a presença da região codificante do antígeno recombinante no DNA das bactérias transformadas.

No início, a estimulação da expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo foi feita nas duas colónias utilizadas na PCR e em mais cinco colónias transformadas com o vetor de expressão, selecionadas aleatoriamente, através da sua incubação a 37 °C durante 3 horas na presença de 1 mM de IPTG. Por forma a criar um controlo de estimulação, para cada colónia, foi feito um controlo, onde não houve

adição de IPTG. Terminado o período de estimulação, foi feita uma eletroforese de proteínas SDS-PAGE, cujo gel resultante pode ser observado na figura 20.

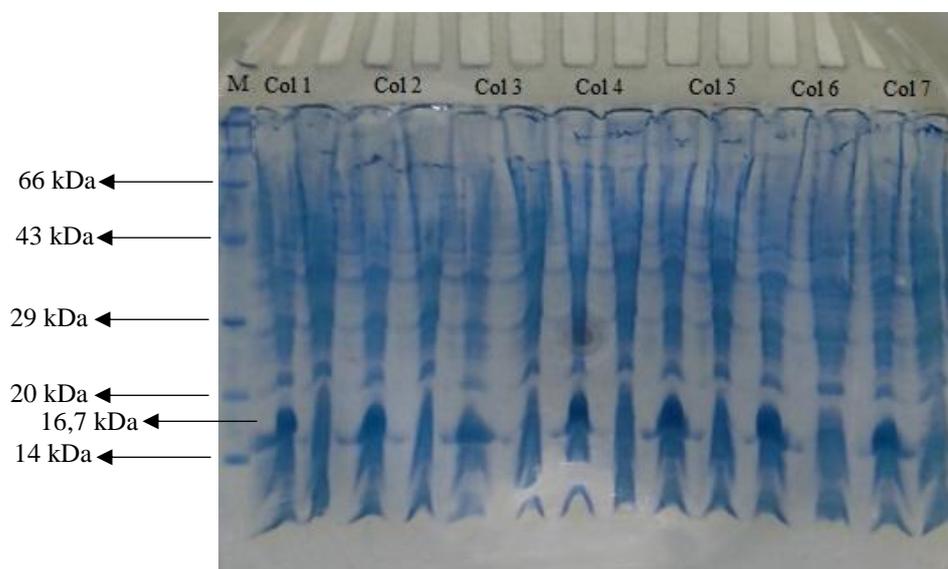


Figura 20. Gel de eletroforese SDS-PAGE do lisado das sete colônias (col 1-col 7) com as respectivas colônias controlo (posicionadas no 2º poço de cada colónia), após estimulação durante 3 horas a 37 °C com 1 mM IPTG. Representação do marcador de pesos moleculares *Roti*[®]-Marker standard Carl Roth (M).

Posteriormente, seis outras colônias, selecionadas aleatoriamente, foram sujeitas a uma incubação durante 18 horas com outras condições de estimulação, tendo-se obtido os resultados apresentados no gel que se segue na figura 21.

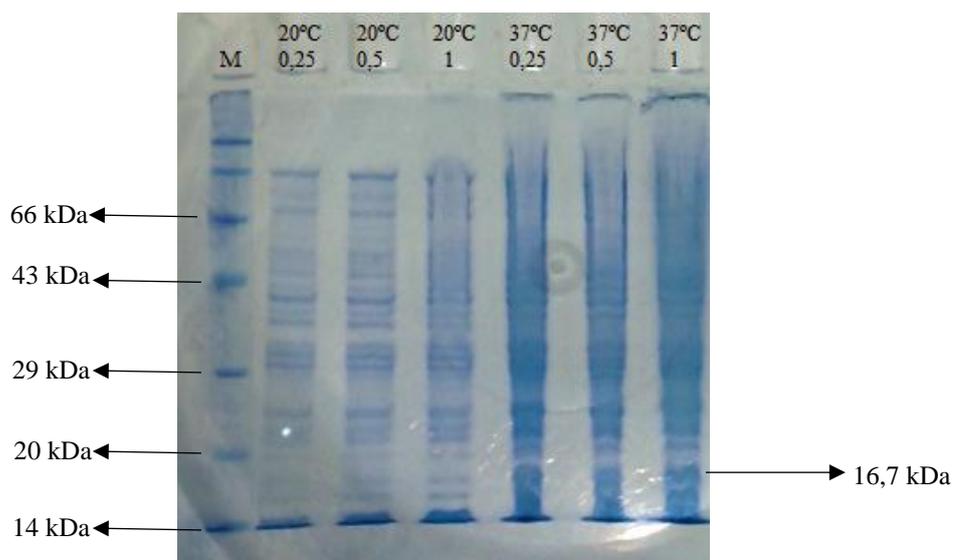


Figura 21. Gel de eletroforese SDS-PAGE do lisado das seis colônias estudadas com seis condições de estimulação distintas (20 °C com 0,25 mM IPTG; 20 °C com 0,5 mM IPTG; 20 °C com 1 mM IPTG; 37 °C com 0,25 mM IPTG; 37 °C com 0,5 mM IPTG; 37 °C com 1 mM IPTG). Representação do marcador de pesos moleculares *Roti*[®]-Marker standard Carl Roth (M).

Como se pode observar nas figuras 20 e 21, as bactérias estimuladas apresentaram uma banda de tamanho correspondente ao do antigénio recombinante sintético multiepítipo (16,7 kDa) quando sujeitas a uma incubação a 37 °C, sendo esta banda mais intensa na presença de uma concentração de 1 mM do indutor da expressão (IPTG). É ainda possível verificar na figura 20 que a banda com tamanho correspondente ao antigénio recombinante está ausente nas células controlo.

Assim, tendo-se percebido qual o melhor método de estimulação, interessava averiguar qual o melhor produto da cultura celular a utilizar para a recuperação do antigénio recombinante sintético multiepítipo produzido. Para tal, estudaram-se quatro produtos distintos (sobrenadante sem estimulação, sobrenadante após estimulação, conteúdo periplasmático após estimulação e sedimento total após estimulação) por ELISA, com recurso a anticorpos monoclonais anti-polihistidina produzidos em rato. Os resultados da técnica estão representados na figura 22, onde se pode observar a média de absorvância final registada a 405 nm, em função do produto da cultura celular analisado em duplicado.

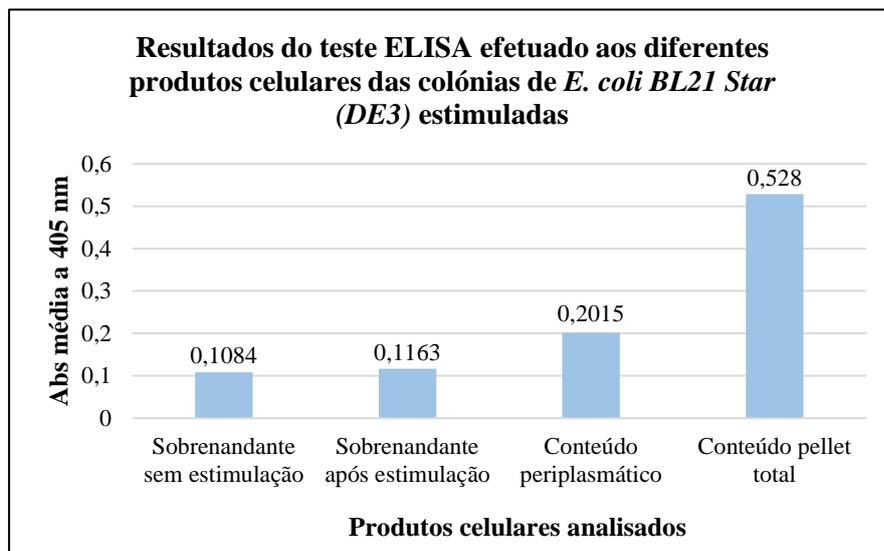


Figura 22. Gráfico representativo do valor médio de absorvância (Abs média) registado em cada produto da cultura celular analisado por técnica de ELISA.

A figura 22 deixa claro que o conteúdo do sedimento total das bactérias transformadas é o produto mais rico no antigénio recombinante sintético multiepítipo que se pretende isolar.

Neste trabalho, foram estudados três diferentes métodos de lise celular para obtenção do conteúdo do sedimento total das células estimuladas. A presença do antígeno nos diferentes lisados foi analisada pela mesma técnica ELISA executada anteriormente. Os resultados estão representados na figura 23.

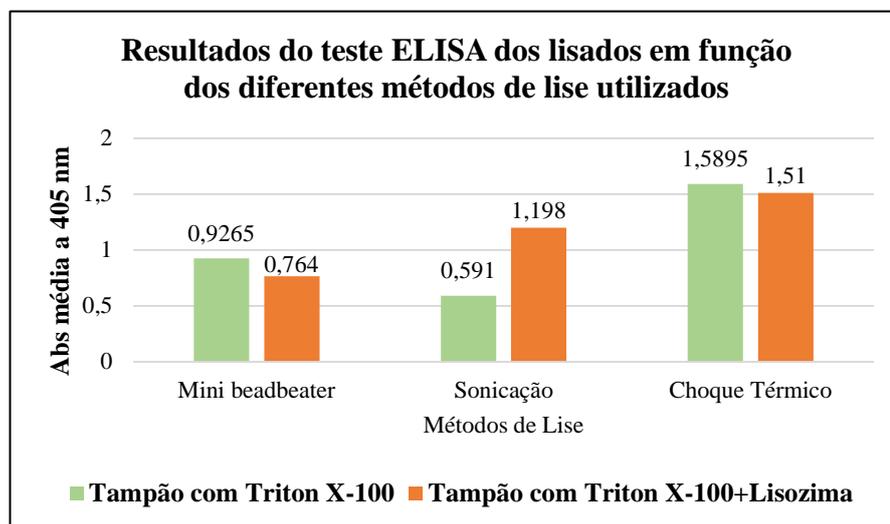


Figura 23. Gráfico representativo do valor médio de absorvância a 405 nm registado em cada lisado, em duplicado, em função do método e tampão de lise utilizados, analisado por técnica de ELISA.

Pela análise da figura 23, o choque térmico com recurso ao tampão com o agente Triton X-100, demonstra ser o método de lise mais eficiente para obtenção do conteúdo do sedimento total das bactérias estimuladas.

De seguida, a purificação do antígeno recombinante sintético multiepítopo foi efetuada através de uma cromatografia de afinidade IMAC onde se utilizou o *kit Ni Sepharose™ 6 Fast Flow* da *GE Healthcare®* e a mini coluna *polyprep* da *Biorad®*. Esta purificação foi feita em etapas, e diferentes produtos foram gerados sequencialmente. Os produtos provenientes dos procedimentos de purificação foram primeiramente analisados por leitura a 280 nm no equipamento *Nanodrop 1000* da *Thermo Scientific®*, para avaliação dos seus conteúdos proteicos, estando os resultados ilustrados nas figuras 24 e 25.

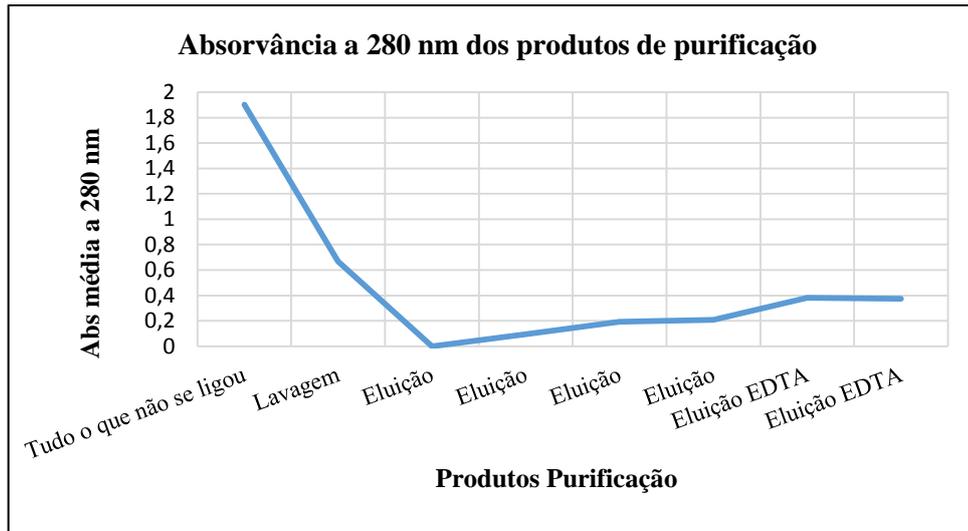


Figura 24. Gráfico representativo do valor das absorvâncias a 280 nm, registadas no aparelho *Nanodrop*, dos oito produtos obtidos sequencialmente, provenientes do procedimento de purificação aconselhado pelo fabricante.

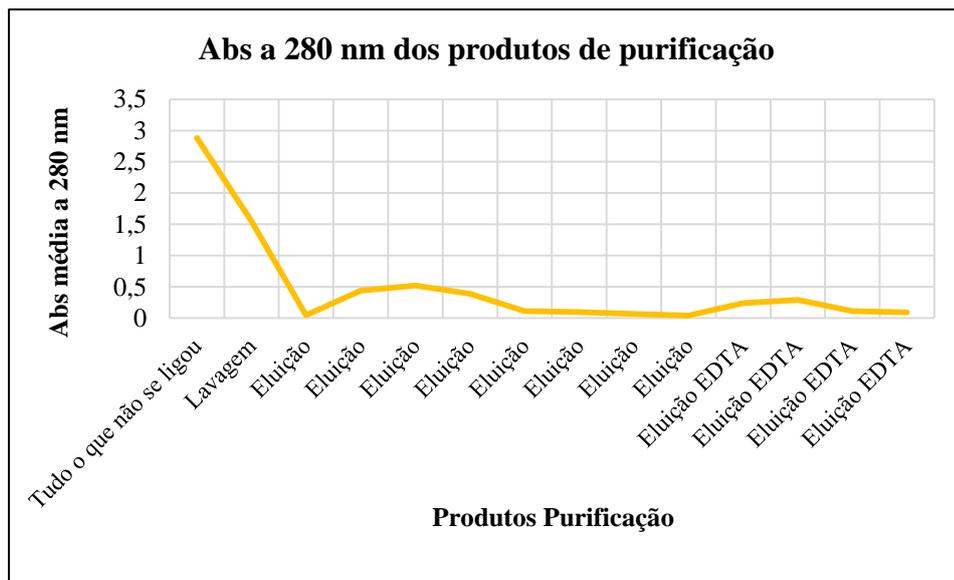


Figura 25. Gráfico representativo do valor das absorvâncias a 280 nm, registadas no aparelho *Nanodrop*, dos 14 produtos obtidos sequencialmente, provenientes da otimização do procedimento de purificação aconselhado pelo fabricante.

A figura 24 revela os resultados obtidos aquando da execução do procedimento de purificação, conforme as recomendações do fabricante, isto é, somente com a obtenção de oito produtos de purificação. Contudo, fez-se uma otimização desse procedimento para garantir a purificação da maior quantidade possível de antigénio

recombinante sintético multiepítipo e, na figura 25, estão representados os resultados obtidos na análise dos 14 produtos de purificação originados sequencialmente.

Os produtos de purificação representados na figura 25 foram também analisados por SDS-PAGE, para aferir a presença ou ausência do antigénio recombinante sintético multiepítipo no conteúdo dos produtos de purificação. Os resultados desta eletroforese estão ilustrados na figura 26.

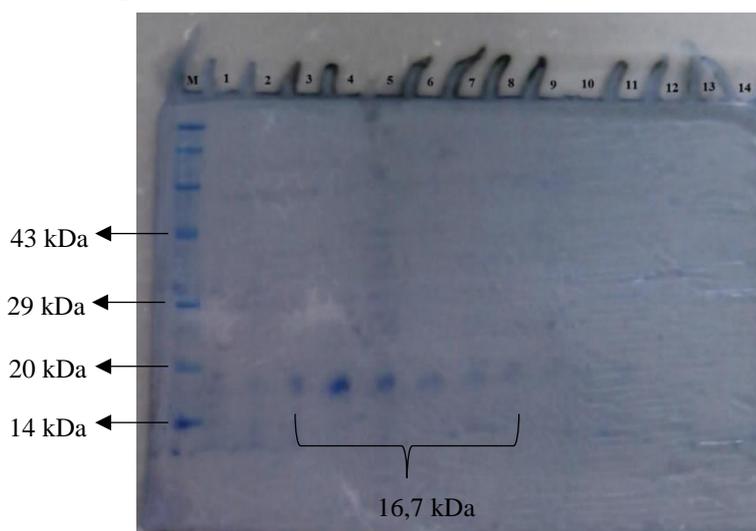


Figura 26. Fotografia do gel de eletroforese SDS-PAGE dos produtos provenientes da otimização do procedimento de purificação aconselhado pelo fabricante (tudo o que não se ligou – 1; lavagens – 2; Eluição – 3 a 10; Eluição com EDTA – 11 a 14) e do marcador de pesos moleculares *Roti*[®]-*Marker standard Carl Roth* (M).

Como se pode observar na figura 26, as eluições 3 a 8, que correspondem a eluições com o tampão de eluição, são as que apresentam melhores resultados, visto exibirem bandas mais intensas, com peso molecular correspondente ao do antigénio recombinante sintético multiepítipo a purificar.

3.5 Caracterização da amostragem para avaliação do antigénio recombinante sintético multiepítipo como biossensor da PPc

Num universo de 97 indivíduos estudados, 80 apresentaram suspeita clínica de PPc e os restantes 17 eram doadores de sangue. Estes doadores eram indivíduos saudáveis com idades compreendidas entre os 18 e os 65 anos e os indivíduos com suspeita de PPc tinham idades compreendidas entre os 7 e os 79 anos, com uma mediana de 42 anos. Relativamente ao género, o sexo masculino era predominante (65 %).

O quadro 20 sumariza a informação clínica e os parâmetros de doença que foram tidos em conta neste estudo, tais como a contagem de células T CD4+, o estado de imunodeficiência, o diagnóstico clínico, o diagnóstico laboratorial, a carga parasitária e o diagnóstico definitivo de cada indivíduo.

Quadro 20. Parâmetros clínicos, imunológicos e laboratoriais dos 80 indivíduos com suspeita de PPc, em estudo.

Parâmetros clínicos	Número (%) indivíduos
Contagem de células T CD4⁺	
> 200 células/mm ³	12 (15)
≤ 200 células/mm ³	30 (37,5)
≤ 50 células/mm ³	14 (17,5)
Sem informação	24 (30)
Estado Imunodeficiência	
VIH	71 (88,75)
Transplantado	6 (7,5)
Oncológico	3 (3,75)
Diagnóstico Clínico de PPc	
Não sugestivo	17 (21,25)
Sugestivo	63 (78,75)
Diagnóstico Laboratorial da PPc	
IFI/AcM +	28 (35)
PCR +	61 (75)
Carga Parasitária	
Negativo para <i>P. jirovecii</i>	19 (23,75)
Baixa	33 (41,25)
Moderada	16 (20)
Elevada	12 (15)
Diagnóstico Definitivo da PPc	
Caso de PPc	50 (62,5)
Infeção subclínica ou portador assintomático	11 (13,75)
Sem infeção por PPc	19 (23,75)

3.6 Aplicação do antígeno recombinante sintético multiepítopo no desenvolvimento de uma técnica de imunodeteção de anticorpos anti-*Pneumocystis jirovecii*

Em paralelo aos testes de diagnóstico anteriormente mencionados para as secreções pulmonares (secção 2.6.2 e 2.6.3, págs. 50 e 51), procedeu-se à realização de uma técnica de ELISA com pesquisa de anticorpos totais e de IgM e IgG anti-*P. jirovecii*, nas amostras de soro dos 97 indivíduos, 17 dadores de sangue e 80 doentes com suspeita de PPc. O fundamento da técnica de ELISA desenvolvida está sintetizado na figura 27.

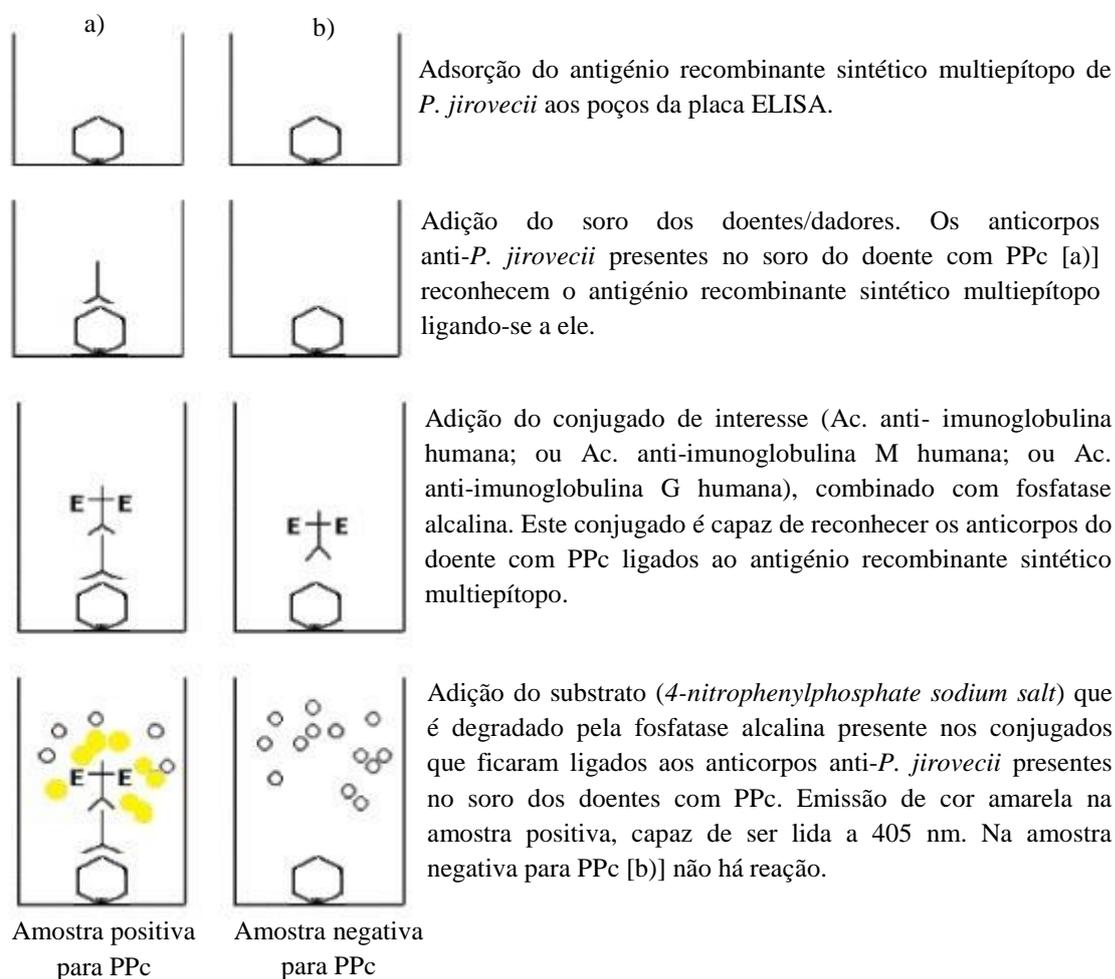


Figura 27. Esquema ilustrativo dos passos da técnica de ELISA para deteção de anticorpos anti-*P. jirovecii*, numa amostra positiva para PPc e numa amostra negativa para PPc, com recurso ao antígeno recombinante sintético multiepítopo.

Para otimização da técnica de detecção de anticorpos anti-*P. jirovecii* por ELISA, fez-se inicialmente uma diluição do antígeno purificado de modo a não saturar os poços da placa ELISA, adicionando-se o antígeno numa concentração de 10 µg/mL. Para isso, calculou-se uma curva de calibração padrão com a proteína albumina sérica bovina (BSA) em diferentes concentrações, tendo-se obtido uma linha de tendência com a equação $y = 0,2546x + 0,0301$ e respetivo R^2 de 0,977. Com recurso à leitura da absorvância a 280 nm do antígeno recombinante sintético purificado no aparelho *Nanodrop*, registou-se uma absorvância de 0,138 que corresponde a uma concentração de 0,42 mg/mL, segundo a equação da reta padrão. Para se obter a concentração desejada, diluiu-se o antígeno purificado a 1:40, em bicarbonato de sódio (H_2CO_3 , 50 mM [pH 8,4]).

De seguida, fez-se o estudo de duas *pools* de amostras, uma positiva, que consistia em soros de indivíduos onde foi detetada a presença de *P. jirovecii*, e outra negativa, que correspondia a soros de indivíduos sem infeção por *P. jirovecii*. As *pools* foram estudadas em diluições seriadas 1:10 e a diferentes tempos e temperaturas de incubação com os soros, com o conjugado, assim como com o substrato. Os resultados estão representados nas figuras 28 e 29.

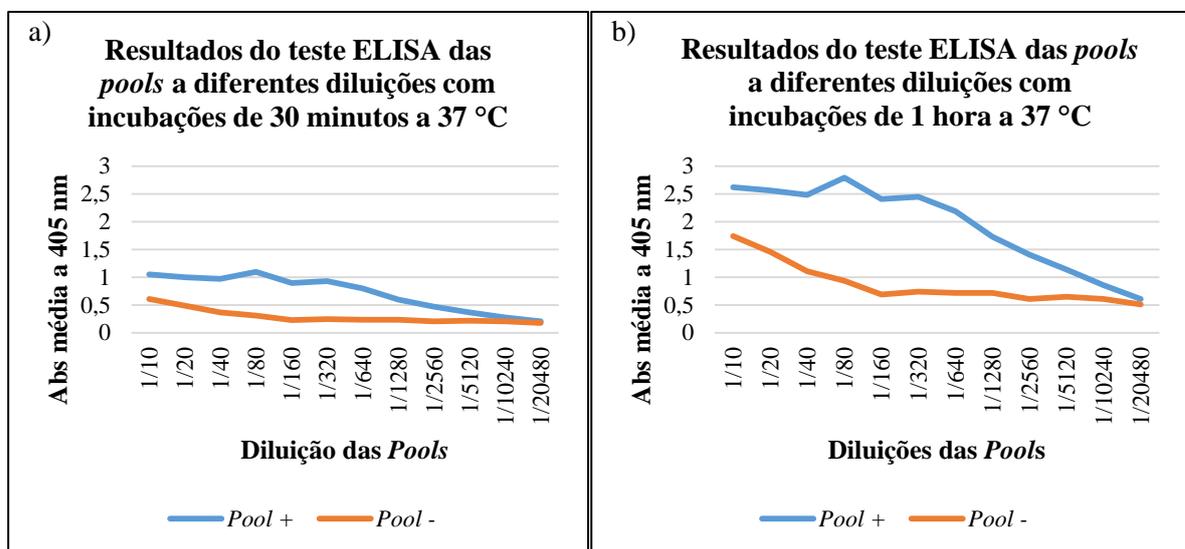


Figura 28. Representação gráfica dos resultados do teste de ELISA das *pools* positiva e negativa, com períodos de incubação de 30 minutos a 37 °C [a]) e de 1 hora a 37 °C [b]) com os soros, com o conjugado e com o substrato.

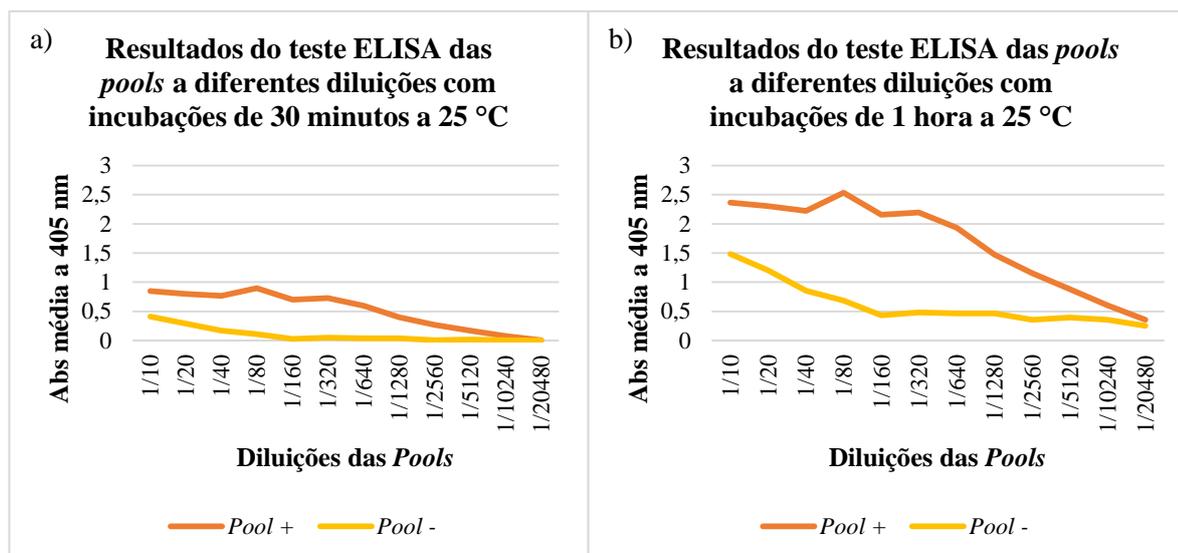


Figura 29. Representação gráfica dos resultados do teste de ELISA das *pools* positiva e negativa, com períodos de incubação de 30 minutos a 25 °C [a)] e de 1 hora a 25 °C [b)] com os soros, com o conjugado e com o substrato.

Pela observação dos gráficos apresentados, a diluição de 1:80 e as condições de incubação de 1 hora a 37 °C, foram as condições que apresentaram resultados com maior reatividade e, ao mesmo tempo, maior diferença de valores entre as duas *pools*, pelo que foram consideradas as condições ideais para o estudo da população. Assim, após otimização da técnica, testaram-se amostras de soro dos 80 doentes com suspeita de PPc e dos 17 dadores de sangue. Para tal, cada amostra foi submetida a três testes ELISA distintos: um para a deteção de anticorpos totais anti-*P. jirovecii*; outro para deteção das IgM anti-*P. jirovecii*; e um terceiro para deteção de anticorpos da classe IgG anti-*P. jirovecii*.

Recorrendo-se ao programa informático SPSS versão 20.0, foram realizados diferentes testes estatísticos que permitiram avaliar a fiabilidade dos diferentes testes ELISA desenvolvidos (Esteves *et al.*, 2014a). A figura 30 representa a distribuição dos valores dos testes ELISA obtidos nas diferentes categorias de indivíduos estudados.

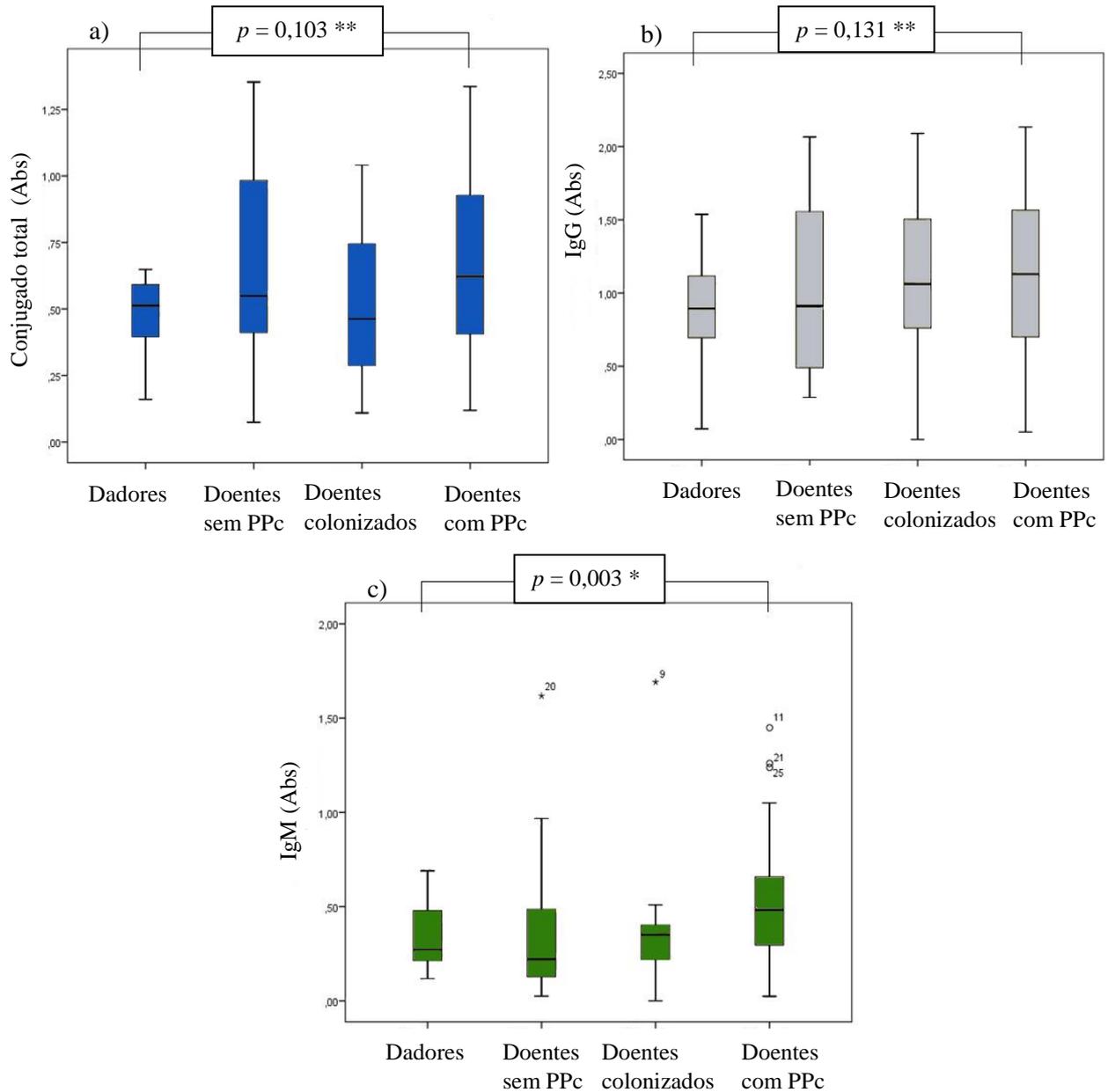


Figura 30. Diagrama de extremos e quartis com representação da distribuição dos valores dos testes ELISA para pesquisa de anticorpos totais [a)], de IgG [b)] e de IgM [a)] anti-*P. jirovecii*, obtidos nas diferentes categorias de indivíduos estudados. A linha horizontal representada no interior das “caixas” corresponde à mediana, isto é, ao valor que divide o conjunto das medições previamente ordenadas em duas partes iguais, o que a torna uma medida de tendência central robusta a valores extremos e adequada a amostras heterogêneas. Representação do valor da estatística de teste para a diferença entre as medianas das categorias de indivíduos (p) sem significado estatístico (**) e com significado estatístico (*).

Para fazer a comparação entre os valores das medianas das quatro categorias de indivíduos analisadas, recorreu-se ao teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*, assumindo-se um nível de significância de 5 %. Na análise da figura 30a, verificou-se que a mediana das absorvâncias obtidas para os valores de anticorpos totais anti-*P. jirovecii* foi de 0,513 nos dadores, 0,549 nos doentes sem PPc, 0,463 nos doentes assintomáticos e de 0,6215 nos doentes com PPc, sendo que a diferença entre as medianas registadas não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O mesmo foi observado para os valores da figura 30b, tendo-se registado medianas de 0,894 nos dadores, 0,911 nos doentes sem PPc, 1,062 nos doentes assintomáticos e de 1,13 nos doentes com PPc. No entanto, na figura 30c, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$), entre os valores das medianas dos quatro grupos de indivíduos analisados, tendo-se registado uma mediana de 0,272 nos dadores, 0,22 nos doentes sem PPc, 0,351 nos doentes assintomáticos e de 0,483 nos doentes com PPc.

Foi avaliado, individualmente, o significado estatístico da diferença dos valores das medianas do teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii*, entre a categoria de indivíduos com PPc e as outras três categorias de indivíduos, através do teste não paramétrico *Mann-Whitney U*. Foi encontrado significado estatístico entre a diferença de valores dos doentes com PPc e dos dadores ($p = 0,024$) e ainda dos doentes com PPc e sem PPc ($p = 0,033$). Por outro lado, não foi encontrado significado estatístico entre a diferença dos valores de IgM no grupo de doentes com PPc e no grupo de doentes colonizados ($p = 0,081$).

Tendo o teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* dado os resultados mais promissores, fomos ainda analisar a produção deste anticorpo em função da carga parasitária dos indivíduos. Os resultados podem ser observados na figura 31 onde, apesar do valor de p não ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$), observa-se um aumento progressivo dos valores de absorvância a acompanhar o aumento da carga parasitária.

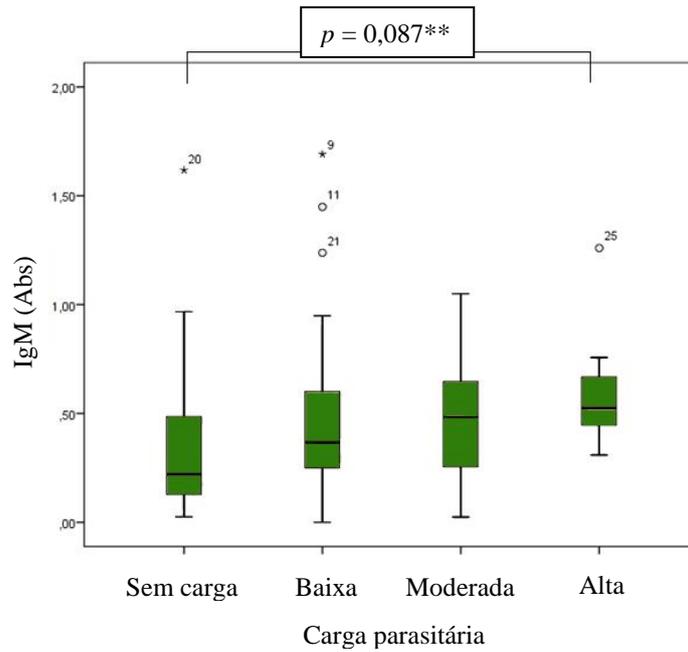


Figura 31. Diagrama de extremos e quartis com representação da distribuição dos valores do teste ELISA para pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii*, obtidos nas diferentes categorias de cargas parasitárias analisadas. Representação do valor da estatística de teste para a diferença entre as medianas das categorias de indivíduos (p) sem diferenças estatisticamente significativas (**).

Para se efetuar um estudo comparativo do desempenho dos três testes ELISA, efetuou-se a análise das curvas ROC para cada um dos testes (ver figura 32).

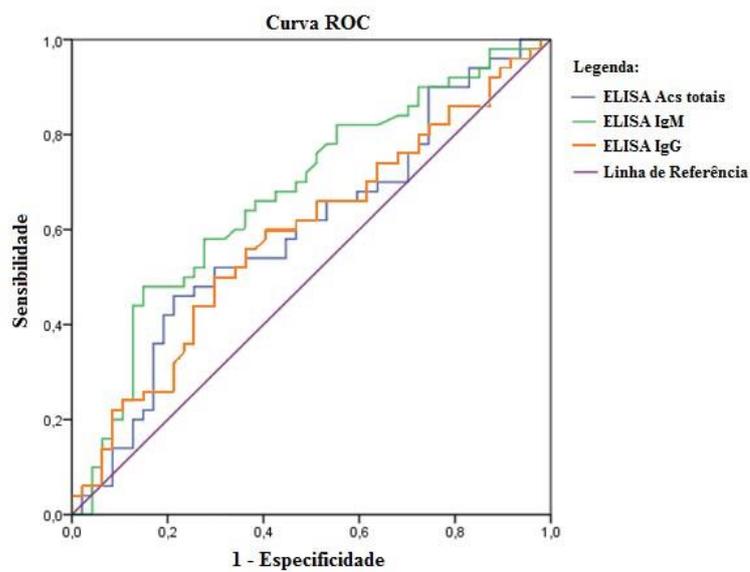


Figura 32. Curvas ROC para os diferentes testes ELISA efetuados neste estudo.

A linha diagonal traçada a roxo, designada linha de referência, permite dividir o espaço ROC, sendo que os pontos acima da diagonal representam os resultados com boa classificação.

A área abaixo da curva (AUC, do inglês, *Area Under the ROC Curve*) de cada teste é uma medida da exatidão desse mesmo teste, uma vez que representa a probabilidade de um resultado do ensaio de um caso de PPc escolhido aleatoriamente, ser superior ao resultado de um ensaio executado a um caso não PPc. Esta área está, então, associada ao poder de discriminação do teste de diagnóstico e, analiticamente, os seus valores podem ser estudados através de métodos estatísticos como o teste *Mann-Whitney U*. Neste estudo, avaliou-se o significado estatístico da área abaixo da curva, para cada teste, através do teste *Mann-Whitney U*, estando os resultados representados no quadro 21.

Quadro 21. Valores das áreas abaixo da curva ROC para os três testes ELISA e valores de *p*, para um nível de significância de 5 %, a elas associados (**) sem significado estatístico, (*) com significado estatístico.

Teste ELISA	AUC	Valor de p
Pesquisa Acs. totais anti- <i>P. jirovecii</i>	0,596	0,103**
Pesquisa IgM anti- <i>P. jirovecii</i>	0,674	0,003*
Pesquisa IgG anti- <i>P. jirovecii</i>	0,589	0,131**

O teste ELISA para pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* apresentou uma área abaixo da curva com significado estatístico ($p = 0,003$), sendo que 67,4 % dos resultados dos doentes com PPc são superiores aos resultados dos testes dos doentes sem PPc. Nos testes ELISA para pesquisa de anticorpos totais e IgG anti-*P. jirovecii*, a área sob a curva não se mostrou estatisticamente significativa ($p = 0,103$ e $p = 0,131$, respetivamente) sendo que somente 59,6 % e 58,9 % dos resultados dos testes em doentes com PPc, respetivamente, apresentariam resultados superiores aos dos doentes sem PPc.

Mostrando o teste ELISA com pesquisa de anticorpos IgM anti-*P. jirovecii* alguma aplicabilidade, o desafio tornou-se escolher um valor de *cut-off* que equilibrasse as necessidades de sensibilidade e especificidade, através da análise do comportamento da curva ROC. Para tal, foram estudadas as características de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de quatro valores de

cut-off distintos, descritos no quadro 22. A este quadro foi também adicionada a estatística do teste chi-quadrado (χ^2) de cada um dos *cut-offs* analisados.

Quadro 22. Medidas estatísticas calculadas para os diferentes *cut-offs* estudados.

<i>Cut-Off</i>	0,250 (Abs)	0,286 (Abs)	0,300 (Abs)	0,350 (Abs)
Sensibilidade	82,0 %	76,0 %	72,0 %	68,0 %
Especificidade	44,7 %	48,9 %	51,1 %	55,3 %
Valor preditivo positivo	61,2 %	61,3 %	61,0 %	61,8 %
Valor preditivo negativo	70,0 %	65,7 %	63,2 %	61,9 %
Estatística de teste χ^2 (p)	0,004	0,011	0,020	0,021

Como o teste ELISA IgM produzido neste estudo, por si só, não apresentava fiabilidade de excelência para o diagnóstico serológico da pneumocistose, os resultados do teste foram associados com os dados disponíveis relativos ao diagnóstico clínico. Assim, considerando os resultados concordantes do teste ELISA com o diagnóstico clínico, é possível fornecer uma resposta com medidas estatísticas bastante satisfatórias, a 56,7 % da população estudada (quadro 23).

Quadro 23. Medidas estatísticas da associação dos resultados do teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* com o diagnóstico clínico para PPC.

Associação do teste ELISA IgM ao diagnóstico clínico da PPC	
Sensibilidade	97,1 %
Especificidade	75,0 %
Valor preditivo positivo	87,2 %
Valor preditivo negativo	93,8 %
Estatística de teste χ^2	< 0,001
Número de indivíduos com concordância entre as variáveis da associação	55

Em virtude dos resultados obtidos, neste trabalho conseguimos produzir um antígeno recombinante sintético multiepítipo específico de *P. jirovecii*, capaz de funcionar como biossensor da PPC, quando aplicado num teste ELISA para pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii*, associado ao diagnóstico clínico de cada doente.

Capítulo 4

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1 Produção, expressão e purificação do antígeno recombinante sintético multiepítopo de *Pneumocystis jirovecii*

Do que tem sido descrito sobre *P. jirovecii* até aos dias de hoje, sabe-se que as principais proteínas antigénicas de superfície de *P. jirovecii* encontradas, quer nos trofozoítos, quer nos quistos, são as glicoproteínas *major* de superfície (Msg) (Stringer, 2005). Na bibliografia mais recente, têm surgido uma série de estudos que recaem num fragmento Msg recombinante relativamente conservado, que codifica a região carboxilo-terminal (fração MsgC), demonstrando resultados potencialmente promissores no imunodiagnóstico e em estudos epidemiológicos da PPc (Daly *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Djawe *et al.*, 2010). Desta análise, destaca-se um estudo em particular (Daly *et al.*, 2002), o qual obteve títulos de anticorpos anti-MsgC mais elevados em doentes seropositivos para VIH com episódio prévio de PPc do que em doentes seronegativos para VIH sem episódio anterior de PPc. Existem ainda evidências da utilidade da produção de antígenos recombinantes sintéticos para posterior aplicação no desenvolvimento de ensaios de imunodiagnóstico (Dai *et al.*, 2012). Assim, o objetivo deste estudo, passou por estudar a fração MsgC descrita por Kieran R. Daly e seus colegas em 2002 e, com ela, construir um antígeno imunogénico para posterior aplicação em testes de imunodeteção de anticorpos anti-*P. jirovecii*.

Kieran R. Daly e seus colegas fizeram a produção das frações recombinantes do gene estudado recorrendo à sequência do gene *MSG* publicada em 1994 (Garbe & Stringer, 1994), com 3351 nucleótidos. A partir da sequência total do gene, os autores sintetizaram *primers* capazes de amplificar três regiões distintas contíguas, às quais posteriormente chamaram MsgA, MsgB e MsgC. No presente estudo, foi efetuada uma análise da sequência da proteína Msg, na base de dados do NCBI, tendo sido selecionada a sequência mais recente, com o maior fragmento descrito, que neste caso corresponde a 1022 aa (GenBank: AEZ01831.1) e 3192 nucleóticos (GenBank: JN792933.1). Devido às atualizações sofridas nas sequências nucleotídicas dos genes *MSG*, o *primer forward* descrito por Kieran R. Daly e seus colegas em 2002, não tem atualmente correspondência na sequência selecionada. No entanto, a sequência do *primer reverse* estava preservada na sua totalidade na porção final da sequência nucleotídica escolhida. Assim, tendo em conta o número de nucleótidos utilizados por aqueles autores (1317 nucleótidos) aquando da construção da fração MsgC no seu

estudo, e utilizando a sequência nucleotídica do seu *primer reverse*, construiu-se um novo *primer forward* e avançou-se com a amplificação da fração MsgC em amostras de DNA de *P. jirovecii* isoladas de amostras caracterizadas como PPc positivas na população portuguesa. Com os resultados obtidos na figura 11 (pág. 56) e com a confirmação de que a sequência correspondente às bandas obtidas na reação de PCR é correspondente à sequência da fração MsgC depositada na base de dados do NCBI (figura 12, pág. 57), ficou comprovada a existência da fração MsgC no DNA do organismo responsável pela PPc na população alvo do presente estudo.

De seguida, selecionaram-se os epítomos, seguindo o que foi anteriormente feito por Jianfang Dai e seus colegas em 2012, aquando da construção de um antigénio recombinante sintético multiepítomo de *Toxoplasma gondii*, para serodiagnóstico da Toxoplasmose. Deste modo, analisou-se o perfil de hidrofobicidade (figura 13a, pág. 58) e a posição (interna ou externa) relativamente à membrana, de um fragmento de 582 aminoácidos correspondentes à porção final da fração MsgB e de toda a fração MsgC. As escalas de hidrofobicidade fornecem valores que definem a hidrofobicidade relativa dos resíduos de aminoácidos. Quanto mais positivo for o valor, mais hidrofóbicos são os aminoácidos localizados nessa região da proteína. Assim, como se pode observar na figura 13a (pág. 58), foi possível verificar que ao longo da sequência de aminoácidos analisada existem muitas zonas com valores negativos e, portanto, hidrofílicas. Estas são as zonas de interesse pois, aquando da obtenção tridimensional da glicoproteína, têm tendência para se apresentar mais expostas no interior ou exterior da superfície celular de *P. jirovecii*. No entanto, neste estudo, interessava selecionar regiões cuja posição antigénica se fizesse no exterior da superfície do microrganismo, com o propósito de estarem expostas e em contacto com o sistema imunológico do hospedeiro. Assim, para avaliar se a orientação das regiões mais hidrofílicas desta sequência de aminoácidos se faz para o interior citoplasmático ou para o exterior celular, fez-se um estudo da sua posição relativamente à membrana, tendo-se obtido uma probabilidade próxima de 1 para uma posição externa, ao longo de toda a região analisada, o que corrobora com o facto de estarmos a trabalhar com uma fração da glicoproteína de superfície do microrganismo.

Em virtude do exposto, todas as zonas com comportamento hidrofílico eram selecionáveis com vista à produção do antigénio recombinante sintético multiepítomo.

No entanto, como se pretendia desenhar um antigénio pouco complexo, partiu-se para uma análise parcelar das regiões com maiores picos de hidrofília e foi feita uma seleção final de três dessas regiões (figura 13b, pág. 58). A seleção da região 1 baseou-se no facto desta apresentar um comportamento hidrofílico marcado ao longo de toda a sua extensão e de não estar posicionada no início da sequência de aminoácidos analisada, o que indica uma localização na fração MsgC. A seleção das regiões 2 e 3 deveu-se ao facto de, para além de possuírem um comportamento hidrofílico, serem regiões terminais da fração MsgC, previsivelmente expostas à superfície do microrganismo e altamente reativas. Não foi feita a seleção de mais nenhuma região para a construção deste péptido, pois pretendíamos construir um antigénio recombinante sintético multiepítopo com menos de 500 aminoácidos, simples de sintetizar, produzir e manusear, por forma a se fazer uma primeira avaliação da utilidade desta abordagem no diagnóstico serológico da PpC.

Feita a seleção das três regiões, um péptido recombinante sintético composto por esses fragmentos, potencialmente imunogénicos, ligados entre si por duas pontes de cinco resíduos de glicina, foi sintetizado (quadro 16, pág. 59). Estas duas pontes foram utilizadas para a ligação das três regiões antigénicas com o objetivo de criar duas espécies de “dobradiças” não reativas, que permitissem que os três fragmentos proteicos adquirissem a sua estrutura tridimensional normal, tendo uma distância entre si que permitisse a interação dos anticorpos com os seus epítomos.

No quadro 17 (pág. 59), pode-se observar que estamos perante um péptido recombinante sintético de pequenas dimensões (152 aminoácidos), baixo peso molecular (16,7 kDa) e ponto isoelétrico básico (pI = 8,57). Este antigénio, quando sintetizado em *E. coli*, leva mais de 10 horas a ser reduzido para metade no interior da célula e apresenta um índice de instabilidade baixo (38,39), refletindo a sua estabilidade. Como era de esperar, é um péptido que apresenta baixo índice de hidropaticidade (-0,702) pois é constituído por regiões altamente hidrofílicas.

Este antigénio foi sintetizado no vetor pUC57-Amp, por este vetor estar otimizado para clonagem em *E. coli*, a bactéria selecionada para propagação do vetor no presente estudo. Optou-se por uma propagação do vetor de clonagem por transformação de *E. coli TOP10*. A estirpe selecionada para clonagem do antigénio recombinante

sintético multiepítopo é considerada ideal, apresentando alta eficiência e replicação estável de elevado número de cópias do plasmídeo (Lifetechnologies, 2014b).

Existem protocolos específicos que aumentam a eficiência de transformação das bactérias e que as tornam mais suscetíveis à transformação, tornando-as células competentes. Neste estudo, as *E. coli TOP10* foram tornadas competentes através do método do cloreto de cálcio baseado nos resultados obtidos por Li e seus colegas em 2010, aquando do aperfeiçoamento de um protocolo clássico (Li *et al.*, 2010). Nesta técnica, a adição de cloreto de cálcio suplementado com glicerol a uma suspensão de células bacterianas, promove a ligação de DNA plasmídico aos lipopolissacarídeos (LPS, do inglês *lipopolysaccharide*) presentes nas paredes bacterianas das células, uma vez que os iões de cálcio, positivamente carregados, atraem tanto a cadeia de DNA, carregada negativamente, como os grupos com carga negativa presentes no interior do núcleo dos LPS, ficando facilitada a passagem de DNA plasmídico para dentro da célula bacteriana (Dagert & Ehrlich, 1979). Posteriormente, esta internalização do vetor foi forçada através de um processo de choque térmico, onde células competentes refrigeradas, a aproximadamente 4 °C, foram aquecidas a uma temperatura mais elevada (42°C), durante um curto período de tempo. Este choque súbito pelo calor, altera a membrana bacteriana fornecendo-lhe maior fluidez, ajudando a internalização de DNA a uma taxa mais rápida, por invaginação da superfície da célula que se encontra ligada ao plasmídeo que transporta o DNA transformante.

Neste trabalho, o processo de transformação por choque térmico foi adaptado com base no conhecimento dos estudos anteriores, tendo em consideração que as condições fisiológicas para a transformação ideal, variam de estirpe para estirpe e com o tipo de plasmídeo utilizado (Mandel & Higa, 1970; Dagert & Ehrlich, 1979; Bergmans, Van Die & Hoekstra, 1981; Huff *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 2010). Assim, as suspensões de *E. coli TOP10* competentes, foram submetidas a uma incubação prolongada, em gelo, em contacto com o vetor pUC57-Amp, para que se desse a ligação de DNA transformante à parede celular da bactéria, ao mesmo tempo que as células bacterianas iam refrigerando. Findo este processo, foi exercido um choque térmico a 42°C, a temperatura que reúne o maior consenso entre os autores, como a causadora de maior eficiência de transformação. Para otimizarmos essa eficiência, estudaram-se quatro tempos de incubação a 42 °C, estando os resultados obtidos ilustrados na figura 14

(pág. 62). Na análise do gráfico desta figura, apurou-se que o tempo ideal de exposição para a estirpe e vetor utilizados estava nos 4 minutos, pois foi onde se verificou maior número de UFC. Verificou-se ainda uma queda acentuada do número de UFC quando da exposição durante apenas mais 1 minuto do que o valor ótimo a 42 °C, o que pode ser explicado pela perda de viabilidade das células em exposições prolongadas a esta temperatura. Por outro lado, o tempo de incubação de 2 minutos, recomendado por muitos dos autores, apesar de ser suficiente, apresentou menor eficiência, o que sugere que as células, ao terem sido colocadas no termociclador refrigeradas, não atingiram instantaneamente a temperatura selecionada, tendo sido necessário um pouco mais de tempo de exposição à temperatura alvo. A não ocorrência de crescimento bacteriano na placa controle validou a técnica de transformação, na medida em que as bactérias não transformadas são incapazes de crescer em meio sólido LB suplementado com ampicilina, pois é o vetor pUC57-Amp que transmite a resistência ao antibiótico utilizado no meio de cultura. Terminado o choque térmico, as suspensões celulares transformadas permaneceram em gelo durante mais 10 minutos, o que, segundo Singh e os seus colegas descreveram em 2010, reduz a “movimentação” das moléculas de DNA plasmídico que não foram internalizadas pelas bactérias durante o choque térmico, permitindo que estas moléculas se mantenham à superfície celular e que, eventualmente, parte delas ainda possam ser internalizadas pela bactéria (Singh *et al.*, 2010).

Após a transformação, interessou confirmar a presença do fragmento, devendo este estar compreendido no vetor plasmídico transformante e possuir, na sua composição, a sequência codificante para o antígeno recombinante sintético multiepítipo a produzir. A sua amplificação foi feita com recurso à técnica de PCR com os *primers* M13 *forward* e *reverse*, em amostras do vetor puro e de colónias transformadas. Como se pode observar na figura 15 (pág. 63), as bandas correspondentes à amplificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo apenas estão presentes nos produtos de amplificação do vetor puro e de uma das colónias transformadas. A ausência de banda e o arrastamento visível nos poços 3 e 4 podem ser explicados pela utilização de grandes quantidades de DNA da colónia estudada, o que não possibilitou a discriminação da banda pretendida. A ausência de banda na amostra controle, veio validar o procedimento. De seguida, a composição nucleotídica das bandas de interesse foi conhecida por sequenciação e, como se pode

ver no quadro 18 (pág. 61), o seu conteúdo corresponde à sequência nucleotídica do antígeno recombinante sintético multiepítipo, ladeada por sequências adicionais do vetor pUC57-Amp e dos *primers* M13 *forward* e *reverse*, oriundas da reação de PCR.

No seguimento deste trabalho, um vetor de expressão do antígeno recombinante sintético multiepítipo foi construído com recurso à tecnologia LIC. Esta tecnologia permite uma rápida e eficiente ligação do vetor de expressão e do gene de interesse, independente da utilização de enzimas de restrição ou da DNA ligase. É um procedimento de clonagem de onde resultam apenas clones recombinantes, gerados entre os produtos de PCR do fragmento a inserir e um vetor amplificado por PCR com *primers* específicos, através da complementaridade das suas extremidades em cadeia simples, produzidas artificialmente pela DNA T4 polimerase (Aslanidis & de Jong, 1990; Aslanidis, de Jong & Schmitz, 1994).

Como se pode ver na figura 16 (pág. 62), o DNA plasmídico de quatro *E. coli* *TOP10* transformadas com o antígeno recombinante sintético multiepítipo, foi utilizado para a síntese de produtos de PCR com extremidades complementares às do vetor de expressão a utilizar, com recurso aos *primers* pLATE 31 *forward* e *reverse* (enunciados no quadro 9 pág. 39). Foi observável a presença de bandas com tamanho correspondente ao amplicão esperado em todas as colónias estudadas. Assim, para confirmar que essas bandas correspondiam à amplificação do antígeno recombinante sintético multiepítipo acrescido de extremidades complementares às do vetor, fez-se a sequenciação das mesmas. O resultado da sequenciação, visível no quadro 19 (pág. 62), permite confirmar que, de facto, as bandas obtidas na PCR eram correspondentes à sequência nucleotídica do antígeno recombinante sintético multiepítipo, ladeado por uma pequena parte da sequência dos *primers* específicos utilizados na amplificação. São estas pequenas sequências que ficam dos *primers*, que forneceram a complementaridade deste fragmento ao vetor de expressão onde vai ser inserido, por ação da DNA T4 polimerase (figura 17 pág. 63).

Estando o fragmento pronto para inserção no vetor de expressão selecionado, recorreu-se ao *aLICator Ligation Independent Cloning and Expression System* da *Thermo Scientific*[®], desenhado para uma rápida e eficiente clonagem e regulação da expressão do gene de interesse em *E. coli*. O vetor de expressão selecionado foi o vetor pLATE31, desenvolvido para expressão de elevados níveis da proteína alvo com cauda

C-terminal de seis resíduos de histidina, o que facilitou o processo de purificação do antígeno. Assim, o fragmento e o vetor foram postos em contacto e o reconhecimento do gene a ser inserido no vetor foi um processo muito eficiente pois a simples mistura dos fragmentos à temperatura ambiente deu lugar aos produtos desejados, através da complementaridade das suas cadeias. As moléculas recombinantes resultantes foram utilizadas na transformação de *E. coli TOP10* e *INVα* competentes, onde a formação de uma ligação covalente na junção vetor-gene, ocorreu já no interior destas células por complementaridade de bases, dando origem a um plasmídeo circular.

Estas bactérias não foram utilizadas com vista à expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo, mas sim para uma replicação eficiente do número de cópias do vetor de expressão gerado. Como se pode observar na figura 18 (pág. 64), as bactérias *INVα* apresentaram maior eficiência de transformação quando comparadas com as bactérias *TOP10*, na medida em que no total somente se obtiveram 22 colónias transformadas de *E. coli TOP10* contra 279 colónias transformadas de bactérias *INVα*.

Por forma a se verificar a amplificação de bandas correspondentes à sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo nas bactérias agora transformadas com o vetor de expressão, foi realizado um protocolo PCR com os *primers* utilizados na tecnologia LIC, tendo-se verificado, na figura 19 (pág. 65), a amplificação de fragmentos com tamanho correspondente ao esperado, que foram excisados do gel e estudados por sequenciação, tendo-se confirmado a presença da sequência nucleotídica do gene de interesse nestes produtos de PCR.

Como se pode ver no anexo 5 (pág. 122), o vetor selecionado para a expressão do antígeno recombinante sintético multiepítopo, faz uso do promotor da RNA polimerase T7 para controlo da expressão dos genes heterólogos em *E. coli*. Assim, a expressão do gene de interesse é controlada através deste forte promotor, especificamente reconhecido pela RNA T7 polimerase, pelo que é necessário fazer a clonagem deste vetor em estirpes de *E. coli* em que a expressão do gene da RNA T7 polimerase esteja sob o controlo de um promotor indutível, como o promotor *lac*. Assim, o vetor de expressão gerado foi utilizado para a transformação de *E. coli BL21 Star (DE3)* (Lifetechnologies, 2014a), conforme recomendação do fabricante do *kit* do vetor, e a presença da sequência do antígeno recombinante sintético multiepítopo foi confirmada no DNA plasmídico destas bactérias.

Uma vez que a expressão do gene de interesse se encontra sob controlo do promotor *lacUV5* presente nas baterias *BL21 star (DE3)*, a indução da expressão, foi feita com recurso a IPTG. O IPTG é um mímico molecular da *allolactose*, um metabolito da lactose capaz de desencadear a transcrição do operão *lac*, o que o torna um composto muito usado na indução da expressão proteica em que o gene de interesse se encontra sob controlo desse promotor (Dai *et al.*, 2012).

A otimização da indução da expressão génica teve início com o estudo de sete colónias transformadas com o vetor de expressão, através de uma incubação a 37 °C durante 3 horas na presença de 1 mM de IPTG. De seguida, fez-se a lise das bactérias estimuladas e os lisados foram analisados por SDS-PAGE e, como se pode observar na figura 20 (pág. 66), todas as colónias apresentaram uma banda intensa entre os 14 e os 20 kDa, quando estimuladas, enquanto esta banda está ausente nas colónias controlo, isto é, nas que não sofreram o processo de indução. Como o antigénio recombinante sintético multiepítipo tem um peso molecular estimado de 16,7 kDa, tudo indica que a presença desta banda se deva à expressão do antigénio, como resultado da estimulação. Outras condições de estimulação foram estudadas e os seus resultados podem ser analisados na figura 21 (pág. 66), onde se observa que, a 20 °C com qualquer das concentrações de IPTG utilizadas, não há a presença da banda de 16,7 kDa de interesse, correspondente à expressão do antigénio recombinante sintético multiepítipo. No entanto, nos casos de estimulação a 37 °C, verificou-se que a banda de interesse estava presente e que a sua intensidade parecia ampliar à medida que a concentração de IPTG utilizada na estimulação era aumentada. Como se pretendia produzir a maior quantidade possível de antigénio recombinante sintético multiepítipo de *P. jirovecii*, com vista à construção de um teste de imunodiagnóstico da PPc, selecionou-se a incubação a 37 °C durante 3 horas com 1 mM de IPTG, como a condição ideal para a estimulação da expressão proteica nas bactérias utilizadas.

De seguida, interessou perceber qual o melhor produto da cultura celular a utilizar para a recuperação do antigénio recombinante sintético multiepítipo. Para tal, estudaram-se quatro produtos distintos: o sobrenadante das culturas das bactérias transformadas, anterior à estimulação com IPTG; o sobrenadante das bactérias transformadas, após o período de estimulação com IPTG; o conteúdo do periplasma das bactérias transformadas, após estimulação; e o conteúdo do sedimento total das

bactérias, também após estimulação com IPTG. Destes produtos, o sobrenadante anterior à estimulação serviu como um controlo negativo para comparação com os restantes produtos. Com a pesquisa do antigénio recombinante sintético multiepítipo no sobrenadante após estimulação, procurou-se perceber se as bactérias expressavam a proteína de interesse para o exterior das suas células. Por outro lado, o estudo do conteúdo do sedimento total permitiu-nos avaliar se a expressão proteica se fez somente no interior da bactéria. Por fim, o estudo do conteúdo do periplasma permitiu-nos estudar a presença do antigénio de interesse no espaço fluido entre a membrana plasmática e a membrana externa das bactérias.

O estudo destes produtos foi efetuado recorrendo-se a uma técnica de ELISA indireta, com recurso a um primeiro anticorpo monoclonal anti-polihistidina produzido em rato, capaz de detetar a presença da cauda de seis resíduos de histidina com que o antigénio recombinante sintético multiepítipo é expresso. Este primeiro anticorpo foi posteriormente reconhecido por um segundo anticorpo, uma IgG anti-rato, que como se encontra conjugada com fosfatase alcalina, permitiu uma degradação do substrato capaz de ser medida a 405 nm. Como se pode observar na figura 22 (pág. 67), tanto o sobrenadante da cultura como o conteúdo do periplasma após estimulação, não apresentam valores significativamente diferentes dos registados para o sobrenadante sem estimulação. No entanto, o conteúdo do sedimento total apresenta valores de absorvância próximos de 0,6 a 405 nm, o que demonstra a deteção da cauda de polihistidina, característica do antigénio recombinante sintético multiepítipo que se procurava isolar. Assim, por forma a se executar a purificação do antigénio recombinante, interessou encontrar um meio eficaz de obtenção do conteúdo do sedimento total das bactérias estimuladas.

Neste trabalho, foram estudados três métodos de lise celular para obtenção do conteúdo do sedimento total das células estimuladas e os seus produtos foram analisados pela mesma técnica de ELISA utilizada para o estudo dos produtos da cultura celular. Como se pode observar na figura 23 (pág. 68), o método que apresenta maior absorvância a 405 nm e, conseqüentemente, maior concentração do antigénio recombinante sintético multiepítipo no lisado é o método do choque térmico, com qualquer um dos tampões de lise utilizados. No entanto, visto que ambos os tampões apresentam eficiência idêntica, optou-se por utilizar o tampão sem lisozima, uma vez

que esta enzima tem peso molecular semelhante ao do antigénio recombinante sintético multiepítopo, o que poderia dificultar o seu processo de purificação, e o que permitiu também diminuir custos de operação.

De seguida, purificou-se o antigénio recombinante sintético multiepítopo através de uma cromatografia de afinidade IMAC. A cromatografia de afinidade com iões metálicos imobilizados a uma resina de agarose é baseada na capacidade desses iões metálicos fazerem a quelação da proteína alvo. Assim, este procedimento apresenta elevada eficiência na purificação de proteínas marcadas com histidina, a partir de um lisado bacteriano, em apenas alguns passos (Block *et al.*, 2009). Iões metálicos bivalentes típicos, como o níquel ou o cobalto, retêm seletivamente proteínas marcadas com histidina, pelo que neste estudo se recorreu ao *kit Ni Sepharose 6 Fast Flow™* da *GE Healthcare* que consiste numa resina de agarose à qual estão acoplados grupos quelantes carregados com iões Ni^{2+} .

A purificação foi feita em etapas com recurso a diferentes tampões e, como se pode observar nos gráficos das figuras 24 e 25 (pág. 69), diferentes produtos foram gerados. Nestes gráficos, é revelada a leitura dos eluídos no aparelho *Nanodrop* a 280 nm, ou seja, a quantidade de proteínas eluídas em cada um dos produtos. Pode-se constatar que o maior valor de absorvância corresponde ao eluído do conteúdo proteico do lisado bacteriano que não ficou retido na resina. Este conteúdo diz respeito a todas as proteínas bacterianas expressas que, por não possuírem a cauda de histidina característica do antigénio a purificar, não ficaram retidas na malha de agarose da resina de purificação. De seguida, estão apresentadas as leituras dos três eluídos provenientes das lavagens da resina com o tampão de ligação, que permitem verificar a eliminação das restantes proteínas sem capacidade de se ligarem à resina.

Os resultados da figura 24 (pág. 69), ilustram o processo de eluição conforme as recomendações do fabricante, onde somente quatro eluídos com recurso ao tampão de eluição e dois eluídos com recurso ao tampão com EDTA foram obtidos. Nestes eluídos, a absorvância lida a 280 nm é, teoricamente, diretamente proporcional à quantidade de antigénio recombinante sintético multiepítopo purificado, eluído da resina. Assim, verifica-se que após quatro eluições com o tampão de eluição e duas eluições com o tampão com EDTA, a quantidade de proteínas a serem eluídas continuava a aumentar, pelo que este número de eluições não era suficiente para eluir

todo o conteúdo de interesse. Ajustes ao procedimento *standard* aconselhado pelo fabricante do *kit* da resina foram efetuados, com o objetivo de se obter a maior quantidade possível de antigénio purificado. Assim, no gráfico da figura 25 (pág. 69), pode-se observar que foi aumentado o número de eluições efetuadas com recurso ao tampão de eluição e, por outro lado, foram também feitas mais lavagens da coluna com o tampão de remoção do níquel (tampão com EDTA), para que a maior quantidade possível de proteínas purificadas fossem recuperadas com ambos os tampões.

Posteriormente, para verificar se as frações proteicas detetadas pela leitura dos eluídos no aparelho *Nanodrop* a 280 nm correspondiam ao antigénio recombinante sintético multiepítopo purificado, fez-se uma análise desses eluídos por eletroforese SDS-PAGE. Como se pode ver na figura 26 (pág. 70), a maior parte do antigénio recombinante sintético multiepítopo foi recuperado nas frações 3 a 8, isto é, nas eluições efetuadas com recurso ao tampão de eluição, pois apresentaram uma banda com peso molecular correspondente ao do antigénio. No final do processo de purificação, obteve-se uma solução de antigénio recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii* constituída pelas frações 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

4.2 Aplicação do antigénio recombinante sintético multiepítopo no desenvolvimento de uma técnica de imunodeteção de anticorpos anti-*Pneumocystis jirovecii* por ELISA

O diagnóstico definitivo da PPC implica a identificação direta de *P. jirovecii* em amostras pulmonares dos doentes com suspeita, nomeadamente no LBA, a amostra de excelência e por isso a mais utilizada. O LBA é obtido através da realização de exames dispendiosos e invasivos (broncofibroscopia) que, muitas vezes devido ao estado de saúde muito debilitado dos doentes, não podem ser realizados ou podem resultar no agravamento desse estado de saúde. É nesta perspetiva que surge a necessidade de desenvolver um método serológico de deteção da infeção.

Níveis séricos da enzima LDH, do componente estrutural β -glucano, do antigénio KL-6 ou da S-adenosilmetionina (SAM), têm sido relacionados com a PPC (Hamada *et al.*, 1998; Teramoto *et al.*, 2000; Tasaka *et al.*, 2007; Kutty *et al.*, 2008; Skelly, Holzman & Merali, 2008; Finkelman, 2010; Held *et al.*, 2011;

Morris & Masur, 2011; Esteves *et al.*, 2014a). No entanto, apesar da sua utilidade, todos estes marcadores serológicos são inespecíficos para *P. jirovecii*. A LDH pode estar aumentada em qualquer outra patologia com lesão celular, enquanto o β -glucano, sendo um constituinte estrutural dos fungos, pode estar aumentado em doentes com outras infeções fúngicas que não a PPc. Já o antigénio KL-6, sendo constituinte dos pneumócitos alveolares do tipo II, pode também sofrer alteração dos seus níveis por qualquer outra patologia que cause lesão no parênquima pulmonar. Por outro lado, a aplicabilidade dos níveis séricos da SAM têm suscitado discórdia entre diversos autores, não estando bem definida qual a relação entre a variação sérica dos níveis de SAM e a infeção por *P. jirovecii*. Além de tudo isso, mesmo recorrendo ao β -glucano, que é o marcador serológico que tem mostrado resultados mais promissores, não existe ainda um valor de *cut-off* seguro para o diagnóstico da PPc (Esteves *et al.*, 2014a).

No que respeita à pesquisa de anticorpos anti-*P. jirovecii*, apesar de já existirem diversos estudos publicados nesta área, tem sido difícil manter um consenso em termos de aplicabilidade dos resultados obtidos, pois os diferentes autores têm estudado a resposta imunológicas de diferentes indivíduos a diferentes frações recombinantes da proteína Msg de *P. jirovecii*. Enquanto uns autores demonstraram que imunocomprometidos seronegativos para VIH revelam níveis de anticorpos, contra a região carboxi-terminal da proteína Msg, significativamente mais elevados do que os seropositivos para VIH (Bishop & Kovac em 2003; Djawe *et al.*, 2013), outros mostraram que indivíduos seropositivos para VIH com episódios prévios de PPc, demonstram níveis de anticorpos, contra a fração MsgC, significativamente mais elevados do que indivíduos seropositivos para VIH que nunca tiveram um episódio anterior desta doença (Daly *et al.*, em 2002; Walzer *et al.*, em 2009).

No entanto, são poucos os trabalhos nesta área que fazem um estudo concomitante das frações IgG e IgM produzidas contra as frações recombinantes da Msg, por forma a avaliar a produção de anticorpos nas diferentes fases da infeção. Contudo, alguns estudos com anticorpos da classe IgG, revelaram níveis de IgG contra diversas frações recombinantes da MsgC, mais elevados em indivíduos prestadores de cuidados de saúde assim como em doentes seropositivos para VIH com história prévia de PPc, comparativamente a indivíduos sem contacto com doentes infetados ou doentes sem história prévia de PPc (Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.*, 2006; Tipirneni *et al.*, 2009;

Djawa *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011). Por outro lado, estudos com anticorpos da classe IgM *anti-P. jirovecii* têm revelado resultados contraditórios, alguns afirmando ter detetado a presença de níveis de IgM superiores em doentes seropositivos para VIH com PPc do que em doentes seropositivos para VIH sem PPc (Djawa *et al.*, 2010). Outros demonstraram níveis similares de IgM *anti-P. jirovecii* entre doentes seropositivos para VIH com e sem PPc (Djawa *et al.*, 2013), havendo ainda há autores que apresentaram resultados da pesquisa de IgM *anti-P. jirovecii* inferiores em doentes seropositivos para VIH com PPc comparativamente a doentes seropositivos para VIH sem a doença (Blount *et al.*, 2012).

Em virtude do exposto, com o antigénio recombinante sintético multiepítipo de *P. jirovecii* produzido e purificado neste estudo, interessou estudar a sua fiabilidade como biossensor para o diagnóstico da PPc. Para isso, desenvolveu-se um teste ELISA, conforme ilustra a figura 27 (pág. 72), onde se procurou perceber se este antigénio recombinante sintético multiepítipo era reconhecido por anticorpos humanos, possibilitando a discriminação de indivíduos com e sem a doença. Com este teste ELISA, fez-se a pesquisa de anticorpos totais e das frações IgM e IgG contra o antigénio recombinante sintético multiepítipo purificado, em indivíduos com e sem a doença.

O teste ELISA executado neste estudo teve, em todos os poços das placas analisadas, 10 µg/mL de antigénio recombinante sintético multiepítipo adsorvido. Em primeiro lugar, este teste foi efetuado com duas *pools* de amostras de soros, sendo uma constituída por soros de indivíduos onde foi detetada a presença de *P. jirovecii* (*pool* positiva), e a outra constituída por amostras de soros de indivíduos sem *P. jirovecii* (*pool* negativa), e ainda com uma amostra de PBS 1x que serviu de controlo negativo. A reatividade de cada uma das *pools* contra o antigénio recombinante sintético multiepítipo foi corrigida fazendo-se a subtração da reatividade registada nos poços com PBS 1x à reatividade dos poços com os soros das *pools*. Estas amostras foram estudadas com vista à otimização e padronização da técnica, fazendo-se a seleção da melhor diluição, assim como das melhores condições de incubação a utilizar, de forma a obter a melhor discriminação possível entre a condição de ter ou não PPc. Nos gráficos apresentados nas figuras 28 e 29 (págs. 73 e 74), a condição que mostrou melhor discriminação entre as *pools* e, ao mesmo tempo, maior reatividade das mesmas, foi a

diluição de 1:80 com períodos de incubação com o soro, com o conjugado e com o substrato de 1 hora a 37 °C, tendo-se registado uma média de absorvância de 2,790 para a *pool* positiva contra uma média de 0,940 para a *pool* negativa.

Neste teste ELISA foram utilizados três conjugados distintos, que permitiram discriminar a presença de anticorpos totais, da fração IgM ou da fração IgG anti-*P. jirovecii*. A presença de anticorpos totais foi determinada pela adição de cadeias leves *kappa* anti-imunoglobulina humana, produzidas em cabra e marcadas com fosfatase alcalina. Já a discriminação da presença de IgM ou IgG foi feita pela adição de cadeias μ anti-imunoglobulina M específicas ou de cadeias γ anti-imunoglobulina G específicas, respetivamente, produzidas em cabra e marcadas com fosfatase alcalina. Como estes conjugados eram soros policlonais e como se obteve, nos testes experimentais com as *pools*, alguma reatividade dos mesmos com a amostra controlo de PBS, optou-se por, em cada teste ELISA, fazer a avaliação da reatividade de cada amostra da nossa população em dois poços. Num primeiro poço, estudou-se a amostra com o antigénio recombinante sintético multiepítopo adsorvido e, no segundo poço, a amostra sem que tenha sido feita adsorção prévia do antigénio. Deste modo, pela subtração da reatividade do segundo poço à do primeiro, fomos capazes de eliminar a interferência de ligações inespecíficas.

Na aplicação desta técnica foi analisado um universo de 97 indivíduos, dos quais 80 estavam diagnosticados com patologia pulmonar e os restantes 17 eram dadores de sangue, ou seja, indivíduos saudáveis. Como se pode ver no quadro 20 (pág. 71), que sumariza a informação clínica e os parâmetros de doença dos 80 indivíduos com patologia pulmonar, verificou-se que existia suspeita clínica de que 78,75 % desses doentes fossem casos de PPc. Através do diagnóstico definitivo, verificou-se que 62,50 % dos doentes estudados tinham PPc, 13,75 % estavam colonizados e que 23,75 % eram doentes sem infeção por *P. jirovecii*. Dos indivíduos infetados com *P. jirovecii*, a maior percentagem (41,25 %) apresentava carga parasitária baixa, em que nenhum quisto é identificado em 30 campos de microscopia, embora as amostras sejam positivas por PCR, 20 % dos indivíduos infetados apresentavam carga parasitária moderada e somente 15 % apresentavam carga parasitária elevada.

Avaliou-se ainda a contagem das células T CD4⁺ nos indivíduos com suspeita de PPc e verificou-se que, de entre os indivíduos cuja informação estava disponível,

37,5 % apresentavam uma contagem inferior a 200 células/mm³ e 17,5 % abaixo das 50 células/mm³, o que é compatível com um risco acrescido para desenvolvimento de doenças oportunistas. Relativamente à origem da imunodeficiência dos doentes, a maioria apresentava infecção por VIH (88,75 %) tendo, no entanto, surgido casos de deficiência imunitária em indivíduos transplantados (7,5 %) ou com doença oncológica (3,75 %), o que vem demonstrar a importância de casos de PPc para além da população seropositiva para VIH.

Com a população em estudo caracterizada, foi possível dividi-la em quatro categorias de indivíduos: doentes com pneumocistose ativa, que correspondem a 51,54 % da população em estudo; portadores de *P. jirovecii* mas sem pneumocistose (colonizados) que correspondem a 11,34 % da população; sem *P. jirovecii* mas com outras patologias pulmonares, que correspondem a 19,59 % da população em estudo; e dadores de sangue, correspondentes a 17,53 % da população. De seguida, realizou-se a pesquisa de anticorpos totais e das frações IgM e IgG contra o antígeno recombinante sintético multiepítopo purificado nas amostras de soro destes indivíduos.

A figura 30 (pág. 75) representa a distribuição dos valores dos testes ELISA para a pesquisa de anticorpos totais, IgG e IgM anti-*P. jirovecii* nas diferentes categorias de indivíduos estudados. Na análise da figura 30a, foi possível verificar que há um aumento de anticorpos totais nos indivíduos com PPc que, no entanto, não se mostrou estatisticamente significativo ($p > 0,05$) em relação aos outros grupos de indivíduos. Na figura 30b, apesar de se verificar um aumento da produção da classe de anticorpos IgG nos indivíduos com PPc, a diferença para os valores registados nos outros grupos de indivíduos também não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto, na figura 30c, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,003$), entre os valores da mediana dos quatro grupos de indivíduos analisados, o que indica que a distribuição dos valores da classe IgM não é aleatória entre os diferentes grupos clínicos estudados.

De seguida, foi avaliado o significado estatístico da diferença entre as medianas das absorvâncias do grupo dos doentes com PPc relativamente aos outros grupos clínicos, tendo-se observado significado estatístico entre a diferença de valores de anticorpos da classe IgM apresentados pelos doentes com PPc e os doentes sem PPc ou dadores. Por outro lado, não foi encontrado significado estatístico entre a mediana dos

valores das absorvâncias de IgM nos doentes com PPc e assintomáticos colonizados. Este resultado pode ser devido ao facto de se terem analisado 50 doentes com PPc contra somente 11 colonizados. Assim, a amostragem de colonizados pode ter contribuído para a falta de robustez estatística. Para clarificar estes resultados, propõe-se um estudo baseado na mesma abordagem mas com um maior número de doentes.

A diferença não significativa entre os valores de anticorpos totais anti-*P. jirovecii* nos diferentes grupos, pode dever-se à ausência de diferença significativa entre os valores de IgG, que comprometeram os resultados obtidos com os anticorpos totais. Estes resultados contrariam bibliografia recente, onde níveis de IgG contra diversas frações recombinantes da MsgC, foram mais elevados em doentes seropositivos para VIH com história prévia de PPc, comparativamente a doentes sem história prévia de PPc (Daly *et al.*, 2002; Daly *et al.*, 2004; Daly *et al.* 2006; Tipirneni *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009; Djawe *et al.*, 2010; Gingo *et al.*, 2011). Esta diferença de resultados pode advir das diferentes regiões recombinantes da fração MsgC analisadas em cada estudo e, também, das diferentes populações estudadas, pois sabe-se que a serologia da PPc varia consoante a distribuição geográfica e a idade dos indivíduos em estudo (Daly *et al.*, 2009; Walzer *et al.*, 2009).

No entanto, com o presente estudo ficou demonstrado que existe, de facto, uma diferença nos níveis de anticorpos IgM, pelo menos, entre os doentes com PPc, sem PPc e dadores, reforçando o que já tinha anteriormente sido descrito por Djawe e seus colegas em 2010 (Djawe *et al.*, 2010), em doentes seropositivos para VIH.

Tendo o teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* demonstrado os melhores resultados, foi feita a análise da produção deste anticorpo em função da carga parasitária. Os resultados podem ser observados na figura 31 (pág. 77) e mostram níveis séricos de IgM tanto maiores quanto maior é a carga parasitária dos doentes, apesar de esta tendência não estar estatisticamente suportada ($p = 0,087$).

Com o intuito de avaliar a utilidade do teste ELISA com pesquisa de anticorpos da classe IgM anti-*P. jirovecii* face à pesquisa de anticorpos totais e da classe IgG, fez-se uma previsão das curvas ROC, que pode ser observada na figura 32 (pág. 77). Esta curva é a representação gráfica da taxa de verdadeiros positivos contra a taxa de falsos positivos para os diferentes *cut-offs* de um teste. Assim, quanto mais a linha se aproxima do quadrante superior esquerdo do gráfico, melhor o desempenho do teste.

Neste estudo, o teste ELISA para pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* é o único que apresenta uma área abaixo da curva com significado estatístico ($p = 0,003$), conferindo resultados superiores a 67,4 % dos indivíduos com PPc, comparativamente aos indivíduos sem PPc. Em virtude do exposto, o teste ELISA com pesquisa de anticorpos IgM anti-*P. jirovecii* parece mostrar alguma aplicabilidade para o diagnóstico serológico da PPc, pelo que interessou estudar a sua fiabilidade e robustez. Um teste ideal deve ser capaz de identificar a totalidade dos casos de doença, pelo que deve ser altamente sensível. Esse mesmo teste deve ainda ser capaz de identificar corretamente todas as pessoas que não tenham a doença, isto é, deve ser específico para a patologia. Assim, procurou-se escolher um valor de *cut-off* para o teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* que equilibrasse as necessidades de sensibilidade e especificidade, através da análise do comportamento da curva ROC. As características do teste para quatro diferentes valores de *cut-off* podem ser analisadas no quadro 22 (pág. 79). A este quadro foi também adicionada a estatística de teste chi-quadrado (χ^2) de cada um dos *cut-offs*, pois este teste permite averiguar até que ponto duas variáveis são ou não independentes. Se o valor de p for inferior ao valor crítico de 0,05, para um nível de significância de 5 %, então rejeitamos a independência das variáveis.

Os resultados obtidos para os diferentes valores de *cut-off* permitiram verificar que à medida que se procurou aumentar o valor da especificidade do teste, provocou-se uma diminuição acentuada na sensibilidade do mesmo, estando o melhor equilíbrio registado nos valores de *cut-off* entre as 0,300 e as 0,350 medidas de absorvância. Em relação ao valor preditivo positivo, não se verificaram alterações significativas entre os diferentes *cut-offs* analisados, no entanto, para o valor preditivo negativo, os melhores resultados situaram-se entre o *cut-off* de 0,250 e 0,300 medidas de absorvância, com valores entre os 65 e os 63 %. Assim, considerou-se que o valor de absorvância de 0,300 é o que melhor estabelece o equilíbrio entre as medidas estatísticas analisadas para o teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii*. Com este valor de *cut-off*, a probabilidade do teste ser negativo quando aplicado a indivíduos que não têm PPc é de 51,1 % e a probabilidade do teste ter um resultado positivo quando aplicado a indivíduos com PPc é de 72 %. Portanto, com este *cut-off*, a probabilidade de um indivíduo com o teste positivo ter, de facto, a doença é de 61 % e, a probabilidade de um indivíduo com um teste negativo não ter, de facto, pneumocistose é de 63,2 %. No

entanto, este valor de *cut-off* selecionado, assim como os outros três estudados, não apresentam medidas estatísticas de excelência que nos permitam assegurar um diagnóstico serológico da PPc de total confiança. Contudo, estes dados mostram que esta abordagem é possível e que, com a realização de ajustes à técnica, como por exemplo o recurso a conjugados de origem monoclonal, o rearranjo da constituição do antígeno recombinante sintético multiepítipo, ou mesmo a otimização da técnica de purificação, se poderá desenvolver um teste de diagnóstico serológico fiável para a PPc.

Apesar de não estarmos perante um novo teste de diagnóstico definitivo da PPc, o teste ELISA com pesquisa de anticorpos IgM anti-*P. jirovecii* desenvolvido neste estudo, pode também vir a ter outras utilidades. Vejamos os dados apresentados no quadro 23 (pág. 79), onde os resultados deste teste foram associados ao diagnóstico clínico de cada indivíduo. Se olharmos para esta associação como um teste de *screening* de casos suspeitos de PPc, isto é, se associarmos os resultados concordantes do teste ELISA com o diagnóstico clínico, conseguimos classificar 55 dos 97 indivíduos em estudo, quanto à condição de ter ou não PPc, com uma sensibilidade de 97,1 % e uma especificidade de 75 %. Os valores preditivos positivo e negativo, ficaram em 93,8 % e 87,2 %, respetivamente, e a estatística do teste χ^2 não deixa dúvidas acerca da dependência do resultado do teste ELISA e do diagnóstico clínico. Assim, a implementação deste teste como um teste de *screening*, poderá contribuir para uma melhoria nos cuidados de saúde, diminuindo a prática de instituição de terapêutica empírica, especialmente em países de baixo-médio rendimento, em doentes com falha respiratória e em crianças, em que a execução de técnicas invasivas como a broncofibroscopia não são fáceis de realizar.

Concluindo, neste trabalho foi possível cumprir os objetivos propostos, tendo-se tido sucesso no desenho e síntese de um antígeno recombinante sintético multiepítipo específico de *P. jirovecii*, capaz de funcionar como biossensor da infeção por *P. jirovecii*, numa técnica de ELISA com pesquisa de anticorpos IgM anti-*P. jirovecii*. Com a aplicação deste teste, associado ao diagnóstico clínico de cada doente com patologia pulmonar e com suspeita de PPc, pensa-se poder vir a diminuir em cerca de 50 % (56,7 %), o número de broncofibroscopia ou outros testes invasivos a efetuar aos doentes, numa fase de *screening* da infeção. Esta associação permite detetar a doença

com sensibilidade de 97,1 % e especificidade de 75 %, pelo que a sua aplicação tem potencial para melhorar a qualidade de vida dos doentes.

Em virtude do exposto, pretende-se, num futuro próximo, realizar estudos com um maior número de amostras para o *cut-off* definido para o teste ELISA produzido, no sentido de determinar a utilidade clínica efetiva deste teste no *screening* da PPc. Procurar-se-á, igualmente, aprimorar este teste com recurso à síntese de novos antígenos recombinantes (quer da fração MsgC, quer de outras frações antigénicas de *P. jirovecii* que se mostrem relevantes num diagnóstico serológico da doença) e à aplicação de conjugados monoclonais, com vista ao desenvolvimento de um teste ELISA capaz, por si só, de realizar um diagnóstico serológico fiável e reproduzível da PPc. Por outro lado, a associação do teste ELISA com pesquisa de IgM anti-*P. jirovecii* ao diagnóstico clínico de cada doente com suspeita de PPc, mostra já grande aplicabilidade em estudos epidemiológicos, na medida em que será possível fazer uma avaliação da imunidade das populações face ao agente etiológico da PPc, com recurso a um biossensor específico de *P. jirovecii* e a uma técnica minimamente invasiva para o doente, bastante sensível e específica na deteção da doença.

Para além disso, como o antígeno recombinante sintético multiepítopo de *P. jirovecii* produzido neste estudo mostrou aplicabilidade como biossensor para a PPc, num futuro próximo, pode-se ainda desenvolver alternativas aos testes de diagnóstico atuais. Com este antígeno, será possível produzir, em murganhos ou fagos, anticorpos recombinantes, capazes de fazer a deteção direta de *P. jirovecii* em amostras biológicas menos invasivas tais como, expectoração induzida, expectoração espontânea, saliva, lavado oral, secreções brônquicas ou aspirado nasofaríngeo.

Por último, o potencial antigénico que este antígeno recombinante sintético multiepítopo demonstrou no presente estudo, suscita curiosidade acerca do seu potencial de imunização, o que pode abrir portas a estudos de desenvolvimento de vacinas contra *P. jirovecii*, partindo da análise de ensaios em murganhos vacinados com o antígeno recombinante sintetizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- ALIOUAT-DENIS, C.M., CHABÉ, M., DEMANCHE, C., ALIOUAT et M., VISCOGLIOSI, E., GUILLOT, J., DELHAES, L. & DEI-CAS, E. (2008) *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 8 (5). p. 708-726.
- ALIOUAT-DENIS, C.M., MARTINEZ, A., ALIOUAT et M., POTTIER, M., GANTOIS, N. & DEI-CAS, E. (2009) The *Pneumocystis* life cycle. 104 (3). p. 419-426.
- ARCENAS, R.C., UHL, J.R., BUCKWALTER, S.P., LIMPER, A.H., CRINO, D., ROBERTS, G.D. & WENGENACK, N.L. (2006) A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 54 (3). p. 169-175.
- ASLANIDIS, C. & DE JONG, P.J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*. 18 (20). p. 6069-6074.
- ASLANIDIS, C., DE JONG, P.J., SCHMITZ, G. (1994) Minimal length requirement of the single-stranded tails for ligation-independent cloning (LIC) of PCR products. *PCR Methods and Applications*. 4 (3). p. 172-177.
- BARRY, S.M. & JOHNSON, M.A. (2001) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV medicine*. 2 (2). p. 123-132.
- BARTLETT, J.A. & HULETTE, C. (1997) Central nervous system pneumocystosis in patient with AIDS. *Clinical infectious diseases*. 25 (1). p. 82-85.
- BAUGHMAN, R.P., STROHOPER, S.S., CLINTON, B.A., NICKOL, A.D. & FRAME, P.I. (1989) The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 113 (9). p. 1062-1065.
- BAVA, A.J., CATTANEO, S. & BELLEGARDE, E. (2002) Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 44 (5). p. 279-282.

- BEARD, C.B., CARTER, J.L., KEELY, S.P., HUANG, L., PIENIAZEK, N.J., MOURA, I.N., 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). p. 265-272.
- BERGKESSEL, M. & GUTHRIE, C. (2013) Colony PCR. *Methods in enzymology*. 529. p. 299-309.
- BERGMANS, H.E.N., VAN DIE, L.M. & HOEKSTRA, P.M. (1981) Transformation in *Escherichia coli*: Stages in the process. *Journal of Bacteriology*. 146 (2). p. 564-570.
- BISHOP, L.R. & KOVACS, J.A. (2003) Quantitation of anti-*Pneumocystis jiroveci* antibodies in healthy persons and immunocompromised patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 187. p. 1844-1848.
- BLOCK, H., MAERTENS, B., SPRIESTERSBACH, A., BRINKER, N., KUBICEK, J., FABIS, R., LABAHN, J. & SCAFER, F. (2009) Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods in Enzymology*. 463. p. 439-473.
- BLOUNT, R.J., JARLSBERG, L.G., DALY, K.R., WORODRIA, W., DAVIS, J.L., CATTAMANCHI, A., DJAWE, K., ANDAMA, A., KOCH, J., WALZER, P.D. & HUANG, L. (2012) Serologic responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein among Uganda patients with respiratory symptoms. *PLoS One*. 7 (12).
- 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). p. 683-701.
- CALDERÓN-SANDUBETE, E.J., VARELA-AGUILAR, J.M., MEDRANO-ORTEGA, F.J., NIETO-GUERRER, V., RESPALDIZA-SALAS, N., de la HORRA-PADILLA, C. & DEI-CAS, E. (2002) Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*. 153 (3). p. 303-310.

Referências Bibliográficas

CARMONA, E.M. & LIMPER, M.D. (2011) Update on the diagnosis and treatment of the *Pneumocystis pneumonia*. *Therapeutic Advances in Respiratory Diseases Journal*. 5 (1). p. 41-59.

CDC | Centers for Disease Control and Prevention (2014). [ONLINE] acesso em: <http://www.cdc.gov> [acedido a 10 de Setembro de 2014].

CHABÉ, M., DEI-CAS, E., CREUSY, C., FLEURISSE, L., RESPALDIZA, N., CAMUS, D. & DURAND-JOLY, I. (2004) Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 23 (2). p. 89-97.

DAGERT, M. & EHRLICH, S.D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6 (1). p. 23-28.

DAI, J., JIANG, M., WANG, Y., QU, L. & SI, J. (2012) Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical and vaccine immunology*. 19 (3). p. 338-342.

DALY, R.K., FICHTENBAUM, C.J., TANAKA, R., LINKE, M.J., O'BERT, R., THULLEN, M.S., HUI, M.S., SMULLIAN, A.G. & WALZER, P.D. (2002) Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jiroveci* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *The journal of infectious diseases*. 186 (5). p. 644-651.

DALY, R.K., KOCH, J., LEVIN, L. & WALZER, P.D. (2004) Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jiroveci*. *Emerging Infectious Diseases*. 10 (5). p. 848-854.

DALY, R.K., KOCH, J., RESPALDIZA, N., de la HORRA, C., MONTES-CANO, M.A., VARELA, J.M., CALDERON, E.J. & WALZER, P.D. (2009) Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. *Clinical microbiology and infection*. 15 (10). p. 937-942.

DALY, R.K., KOCH, J.V., SHIRE, N.J., LEVIN, L. & WALZER, P.D. (2006) Human immunodeficiency virus-infected patients with prior *Pneumocystis* pneumonia exhibit increased serologic reactivity to several major surface glycoprotein clones. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13 (10). p. 1071-1078.

de CASTRO, N., PAVIE, J., LAGRANGE-XÉLOT, M. & MOLINA, J.M. (2007) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with cancer: is it unavoidable? *Revue des maladies respiratoires*. 24 (6). p. 741-750.

de SOUZA, W. & BENCHIMOL, M. (2005) Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 100 (8). p. 903-908.

DEI-CAS, E. (2000) *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Medical mycology*. 1 p. 23-32.

DEMANCHE, C., WANERT, F., BARTHÉLEMY, M., MATHIEU, J. (2005) Molecular and serological evidence of *Pneumocystis* circulation in a social organization of healthy macaques (*Macaca fascicularis*). *Microbiology*. 151 (9). p. 3117-3125.

DIETERICH, D.T., LEW, E.A., BACON, D.J., PEARLMAN, K.I. & SCHOLLES, J.V. (1992) Gastrointestinal pneumocystosis in HIV-infected patients on aerosolized pentamidine: report of five cases and literature review. *The American journal of gastroenterology*. 87(12). p. 1763-1770.

DJAWE, K., DALY, K.R., LEVIN, L., ZAR, H.J. & WALZER, P.D. (2013) Humoral immune responses to *Pneumocystis jirovecii* antigens in HIV-infected and uninfected young children with *Pneumocystis* Pneumocia. *PLoS One*. 8 (12).

DJAWE, K., HUANG, L., DALY, K.R., LEVIN, L., KOCH, J., SCHWARTZMAN, A., FONG, S., ROTH, B., SUBRAMANIAN, A., GRIECO, K., JARLSBERG, L. & WALZER, P.D. (2010) Serum antibody levels to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in the diagnosis of *P. jirovecii* pneumonia in HIV+ patients. *PLoS One*. 5 (12).

Referências Bibliográficas

DOHN, M.N., WHITE, M.L., VIGDORTH, E.M., RALPH, C.B., HERTZBERG, V.S., BAUGHMAN, R.P., SMULLIAN, A.G. & WALZER, P.D. (2000) Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 162 (5). p. 1617-1621.

DUMOULIN, A., MAZARS, E., SEGUY, N. & GARGALLO-VIOLA, D. (2000) Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 19 (9). p. 671-678.

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). p. 405-10.

EDMAN, J.C., EDMAN, U., CAO, M., LUNDGREN, B., KOVACS, J.A. & SANTI, D.V. (1989a) Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (22). p. 8625-8629.

EDMAN, J.C., EDMAN, U., LUNDGREN, B. & SANTI, D.V. (1989b) Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86 (22). p. 8625-8629.

ESTEVES, F., LEE, C.H., de SOUSA, B. BADURA, R., SERINGA, M., FERNANDES, C., GASPAR, J.F., ANTUNES, F. & MATOS, O. (2014a) (1-3)-beta-D-glucan in association with lactate dehydrogenase as biomarkers of *Pneumocystis* pneumonia (PcP) in HIV-infected patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 33 (7). p. 1173-1180.

ESTEVES, F., MEDRANO, F.J., de ARMAS, Y., WISSMANN, G., CALDERÓN, E.J. & MATOS, O. (2014b) *Pneumocystis* and pneumocystosis: first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries – a mini-review. *Expert review of anti-infective therapy*. 12 (5). p. 545-548.

FINKELMAN, M.A. (2010) *Pneumocystis jirovecii* infection: Cell wall (1-3)-D-glucan biology and diagnostic utility. *Critical review in microbiology*. 36 (4). p. 271-81.

- GARBE, T.R., & STRINGER, J.R. (1994) Molecular Characterization of clustered variants of genes encoding major surface antigens of human *Pneumocystis carinii*. *Infection and Immunity*. 62 (8). p. 3092-3101.
- GIGLIOTTI, F., CROW, E.L., BHAGWAT, S.P. & WRIGHT, T.W. (2006) Sensitized CD8⁺ T cells fail to control organism burden but accelerate the onset of lung injury during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infection and immunity*. 74 (11). p. 6310-6316.
- GINGO, M.R., LUCHT, L., DALY, K.R., DJAWE, K., PALELLA, F.J., ABRAHAM, A.G., BREAM, J.H., WITT, M.D., KINGSLEY, L.A., NORRIS, K.A., WALZER, P.D. & MORRIS, A. (2011) Serologic responses to *Pneumocystis* proteins in human immunodeficiency virus patients with and without *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 57 (3). p. 190-196.
- GUTTLER, R., SINGER, P.A., AXLINE, S.G., GREAVES, T.S. & McGRILL, J.J. (1993) *Pneumocystis carinii* thyroiditis. Report of three cases and review of the literature. *Archives of internal medicine*. 153 (3). p. 393-396.
- HAMADA, H., KOHNO, N., YOKOYAMA, A., HIRASAWA, Y., HIWADA, K., SAKATANI, M. & UEDA, E. (1998) KL-6 as a serologic indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised hosts. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 37 (3). p. 307-310.
- HASLETON, P.S., CURRY, A. & RANKIN, E.M. (1981) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a light microscopical and ultrastructural study. *Journal of clinical pathology*. 34 (10). p. 1138-1146.
- HELD, J., KOCH, M.S., REISCHL, U., DANNER, T. & SERR, A. (2011) Serum (1-3)- β -D-glucan measurement as an early indicator of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and evaluation of its prognostic value. *Clinical microbiology and infection*. 17 (4). p. 595-602.
- HONG, S.T., LEE, M., SEO, M., CHOO, D.H., MOON, H.R. & LEE, S.H. (1995) Immunoblot analysis for serum antibodies to *Pneumocystis carinii* by age and intensity of infection in rats. *The Korean Journal of Parasitology*. 33 (3). p. 187-194.

Referências Bibliográficas

HUANG, L., CATTAMANCHI, A., DAVIS, J.L., den BOON, S., KOVACS, J., MESHNICK, S., MILLER, R.F., WALZER, P.D., WORODRIA, W. & MASUR, H. (2011) HIV-associated *Pneumocystis pneumonia*. *Preceedings of the American Thoracic Society*. 8 (3). p. 294-300.

HUFF, J.P., GRANT, B.J., PENNING, C.A. & SULLIVAN, K.F. (1990) Optimization of routine transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *BioTechniques*. 9 (5). p. 570-572, 574, 576-577.

HUGGETT, J.F., TAYLOR, M.S., KOCJAN, G., EVANS, H.E., MORRIS-JONES, S., GANT, V., NOVAK, T., COSTELLO, A.M., ZUMLA, A. & MILLER, R.F. (2008) Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*. 63 (2). p. 154-159.

HUGHES, W.T., McNABB, P.C., MAKRES, T.D. & FELDMAN, S. (1974) Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumpcystis carinii* oneumonitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 5 (3). p. 289-293.

KELLY, M-N. & SHELLITO, J.E. (2010) Current understanding of *Pneumocystis* immunology. *Future microbiology*. 5 (1). p. 43-65.

KUTTY, G., HERNANDEZ-NOVOA, B., CZAPIGA, M. & KOVAKS, J.A. (2008) *Pneumocystis* encodes a functional S-adenosylmethionine synthetase gene. *Eukaryotic Cell*. 7 (2). p. 258-267.

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). p. 728-730.

LI, X., SAD, S., KÄGI, D. & MOSMANN, T.R. (1997) CD8 Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions. *Journal of immunology*. 158 (9). p. 4152-4161.

LI, X., SUI, X., ZHANG, Y., SUN, Y., ZHAO, Y., ZHAI, Y. & WANG, Q. (2010) An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. *African Journal of Biotechnology*. 9 (50). p. 8549-8554.

Lifetechnologies | One Shot[®] *BL21 Star™ (DE3)* Chemically Competent *E. coli* (2014a). [ONLINE] acesso em: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C601003> [acedido a 10 de Setembro de 2014].

Lifetechnologies | One Shot[®] *TOP10* Chemically Competent *E. coli* (2014b). [ONLINE] acesso em: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C404010> [acedido a 10 de Setembro de 2014].

MANDEL, M. & HIGA, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Biotechnology*. 24. p. 198-201.

MARTINEZ, A., ALIOUAT, el M., STANDAERT-VITSE, A., WERKMEISTER, E., POTTIER, M., PINÇON, C., DEI-CAS, E. & ALIOUAT-DENIS, C.M. (2011) Ploidy of cell-sorted trophic and cystic forms of *Pneumocystis carinii*. *PLoS One*. 6 (6).

MATOS, O., COSTA, M.C., CORREIA, I., MONTEIRO, P., VIEIRA, J.R., SOARES, J., BONNET, M., ESTEVES, F. & ANTUNES, F. (2006) *Pneumocystis jirovecii* infection in imunocompetente patients with pulmonar disorders, in Portugal. *Acta médica portuguesa*. 19 (2). p. 121-126.

MEUWISSEN, J.H., TAUBER, I., LEEUWENBERG, A.D., BECKERS, P.J. & SIEBEN, M. (1977) Parasitologic and serologic observations on infection with *Pneumocystis* in humans. *The Journal of infectious diseases*. 136 (1). p. 43-49.

MILLER, R.F., HUANG, L. & WALZER, P.D. (2013) *Pneumocystis* pneumonia associated with human immunodeficiency virus. *Clinics in chest medicine*. 34 (2). p. 229-241.

MORRIS AM & MASUR H. (2011) A serologic test to diagnose *Pneumocystis* pneumonia: are we there yet? *Clinical Infectious Disease*. 53 (2). p. 203–204.

Referências Bibliográficas

MORRIS, A., LUNDGREN, J.D., MASUR, K., 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). p. 1713-1720.

MORTIER, E., POUCHOT, J., BOSSI, P. & MOLINIÉ, V. (1995) Maternal-fetal transmission of *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine*. 332 (12). p. 825

OLSSON, M., SUKURA, A., LINDBERG, L.A. & LINDER, E. (1996) Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 28 (3). p. 279-282.

OZ, H.S. & HUGHES, W.T. (2000) Search for *Pneumocystis carinii* DNA in upper and lower respiratory tract of humans. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 37 (3). p. 161-164.

PHAIR, J., MUÑOZ, A., DETELS, R., KASLOW, R., RINALDO, C. & SAAH, A. (1990) The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type I. Multicenter AIDS cohort study group. *The New England journal of medicine*. 322 (3). p. 161-165.

PIFER, L.L., HUGHES, W.T., STAGNO, S. & WOODS, D. (1978) *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics*. 61 (1). p. 35-41.

READHEAD, S.A., CUSHION, M.T., FRENKEL, J.K. & STRINGE, J.R. (2006) *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *The journal of eukaryotic microbiology*. 53 (1). p. 2-11.

RIVERO, L., de la HORRA, C., MONTES-CANO, M.A., HERRERA-RODRÍGUEZ, A, RESPALDIZA, N., FRIAZA, V., MORILLA, R., GUTIÉRREZ, S., VARELA, J.M., MEDRANO, F.J. & CALDERÓN, E.J. (2008) *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerging infectious diseases*. 14 (7). p. 1116-1118.

RUFFOLO, J.J., CUSHION, M.T. & WALZER, P.D. (1989) Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *The Journal of protozoology*. 36 (1). p. 53S-54S.

- RUGGLI, G.M., WEBER, R., MESSMER, E.P., FONT, R.L., MOLL, C. & BERNAUER, W. (1997) *Pneumocystis carinii* infection of the conjunctiva in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *Ophthalmology*. 104 (11). p. 1853-1856.
- SATTLER, F.R., COWAN, R., NIELSEN, D.M. & RUSKIN, J. (1988) Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with pentamidine for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A prospective, noncrossover study. *Annals of internal medicine*. 109 (4). p. 280-287.
- SHELLITO, J., SUZARA, V.V., BLUMENFELD, W., BECK, J.M., STEGER, H.J. & ERMAK, T.H. (1990) A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *The journal of clinical investigation*. 85 (5). p. 1686-1693.
- 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). p. 3409-3410.
- SINGER, C., ARMSTRONG, D., ROSE, P.P. & SCHOTTENFELD, D. (1975) *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. *Annals of internal medicine*. 82 (6). p. 772-777.
- SINGH, M., YADAV, A., MA, X. & AMOAH, E. (2010) Plasmid DNA Transformation in *Escherichia Coli*: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl₂ Treated Cells. *Internacional Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 6 (4). p. 561-568.
- SKELLY, M.J., HOLZMAN, R.S. & MERALI, S. (2008) S-adenosylmethionine levels in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Clinical infectious diseases*. 46 (3). p. 467-471.
- SMULIAN, A.G., SULLIVAN, D.W., LINKE, M.J., HALSEY, N.A., QUINN, T.C., MacPHAIL, A.P., HERNANDEZ-AVILA, M.A., HONG, S.T. & WALZER, P.D. (1993) Geographic variation in the humoral response to *Pneumocystis carinii*. *The Journal of infectious diseases*. 167 (5). p. 1243-1247.

Referências Bibliográficas

SOWDEN, E. & CARMICHAEL, A.J. (2004) Autoimmune inflammatory disorders, systemic corticosteroids and *Pneumocystis pneumonia*: a strategy for prevention. *BMC infectious diseases*. 4 (42).

STRINGER, J.R. & KEELY, S.P. (2001) Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infection and immunity*. 69 (2). p. 627-639.

STRINGER, J.R. (1996) *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? *Clinical microbiology reviews*. 9 (4). p. 489-498.

STRINGER, J.R. (2005) Surface Antigens. In: Walzer, P. & Cushion, M. (eds.). *Pneumocystis Pneumonia*. Third Edition Volume 194 p(95-126). New York: Marcel Dekker

STRINGER, J.R., BEARD, C.B., MILLER, R.F. & WAKEFIELD, A.E. (2002) A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging infectious diseases*. 8 (9). p. 891-896.

TANG, X., BARTLETT, M.S., SMITH, J.W., LU, J.J. & LEE, C.H. (1998) Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii f. sp. Hominis*. *Journal of clinical microbiology*. 36 (9). p. 2491-2494.

TASAKA S., HASEGAWA N., KOBAYASHI S., YAMADA, W., NISHIMURA, T., TAKEUCHI, T. & ISHIZAKA, A. (2007) Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest*. 131 (4). p. 1173–1180.

TERAMOTO, S., SAWAKI, D., OKADA, S. & OUCHI, Y. (2000) Markedly increased plasma (1-3)-beta-D-glucan is a diagnostic and therapeutic indicator of *Pneumocystis carinii pneumonia* in a non-AIDS patient. *Journal of medical microbiology*. 49 (4). p. 393-394.

THOMAS, C.F. Jr. & LIMPER, A.H. (2004) *Pneumocystis pneumonia*. *The New England journal of medicine*. 350 (24). p. 2487-2498.

TIPIRNENI, R., DALY, K.R., JARLSBERG, L.G., KOCH, J.V., SWARTZMAN, A., ROTH, B.M., WALZER, P.D. & HUANG, L. (2009) Healthcare worker occupation and immune response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases*. 15 (10) p. 1590-1597.

- VARGAS, S.L., HUGHES, W.T., SANTOLAYA, M.E., ULLOA, A.V., PONCE, C.A., CABRERA, C.E., CUMSILLE, F. & GIGLIOTTI, F. (2001) Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical infectious diseases*. 32 (6). p. 855-861.
- VARGAS, S.L., HUGHES, W.T., WAKEFIELD, A.E. & OZ, H.S. (1995) Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *The journal of infectious diseases*. 172 (2). p. 506-510.
- VAVRA, J. & KUCENA, K. (1970) *Pneumocystis carinii delanoë*, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *The Journal of protozoology*. 17 (3). p. 463-83.
- VOGEL, M., WEISSGERBER, P., GOEPPERT, B., HETZEL, J., VATLACH, M., CLAUSSEN, C. & HORGER, M. (2011) Accuracy of serum LDH elevation for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Swiss Medical Weekly*. 141.
- VOSSEN, M.E., BECKERS, P.J., MEUWISSEN, J.H. & STADHOUDERS, A.M. (1978) Developmental biology of *Pneumocystis carinii*, and alternative view on the life cycle of the parasite. *Zeitschrift für parasitenkunde*. 55 (2). p. 101-118.
- WAKEFIELD, A.E., PIXLEY, F.J., BANERJI, S., SINCLAIR, K., MILLER, R.F., MOXON, E.R. & HOPKIN, J.M. (1990) Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet*. 336 (8713). p. 451-453.
- WALZER, P.D. & RUTLEDGE, M.E. (1981) Humoral immunity in experimental *Pneumocystis carinii* infection. I. Serum and bronchial lavage fluid antibody responses in rats. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 97 (6). p. 820-833.
- WALZER, P.D. (1999). Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 6 (2). p. 149-155.
- WALZER, P.D., DJAWE, K., LEVIN, L., DALY, K.R., KOCH, J., KINGSLEY, L., WITT, M., GOLUB, E.T., BREAM, J.H., TAIWO, B. & MORRIS, A. (2009) Long-term serologic responses to the *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein in HIV-positive individuals with and without *P. jirovecii* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 199 (9). p. 1335-1344.

Referências Bibliográficas

YONEDA, K. & WALZER, P.D. (1983) Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells studied by freeze-fracture electron microscopy. *Infection and immunity*. 40 (2). p. 812-815.

YPMA-WONG, M.F., FONZI, W.A. & SYPHERD, P.S. (1992) Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infection and immunity*. 60 (10). p. 4140-4145.

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo - Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR

- 1 - A 15 μL de produto de reação de PCR, adicionou-se 1,5 μL de tampão de aplicação (Fermentas[®]);
- 2 - A 1,5 μL de marcador molecular de 100 pb e/ou 1 Kb (*Gene Ruler*[™] 100 pb e 1 Kb; Fermentas[®]), adicionou-se 1,5 μL de tampão de aplicação e 7 μL de água desionizada estéril;
- 3 - Numa tina de eletroforese, aplicou-se um gel de agarose a 1 % (m/v) (*SeaKem LE; FMC BioProducts*[®]) em tampão TAE 1x (TrisAcetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8,3), no qual foi incorporado brometo de etídio (Sigma[®]), a uma razão de 0,5 mg/L;
- 4 - Aplicou-se as amostras nos poços respetivos e a separação eletroforética foi efetuada a 60 volts (V), durante 1 hora;
- 5 - Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados, por ação de luz ultravioleta, num transiluminador (ECX-20M; *Vilber Lourmat*[®]);
- 6 - Os resultados foram registados com uma máquina fotográfica digital do sistema de aquisição de imagem incorporado ao transiluminador (*PowerShot A710 IS; Canon*[®]).

Anexo 2

Protocolo – Purificação dos produtos de PCR após eletroforese em gel de agarose através do *JetQUICK Purification Spin kit* da GENOMED®

Primeira fase – Solubilização da agarose: em tubo *ependorf* de 1,5 mL, por cada 100 mg de gel de agarose, adicionou-se 300 µL da solução L1 (NaClO₄, acetato de sódio e TBE) que permitiu a solubilização da agarose onde está retido o fragmento de DNA a purificar. De seguida, esta solução incubou a 50 °C durante 30 minutos, com homogeneização (*vortex*) em intervalos de 10 minutos.

Segunda fase – Aplicação em coluna *JetQUICK* e adsorção de DNA à coluna: finda a incubação, colocou-se as colunas *JetQUICK* em *ependorfs* coletores de 2 mL e transferiu-se, até um máximo de 600 µL (por coluna), a mistura obtida no passo anterior. Seguiu-se uma centrifugação a 20000 g durante 1 minuto, da qual se descartou o filtrado. Às colunas adicionou-se 400 µL da solução L1 e aguardou-se 1 minuto. De seguida, procedeu-se a nova centrifugação a 20000 g durante 1 minuto e descartou-se o filtrado.

Terceira fase – Lavagem da coluna *JetQUICK*: adicionou-se 250 µL de solução H2 (Etanol, NaCl, EDTA e Tris-HCl) à coluna e aguardou-se 5 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 20000 g durante 1 minuto e desprezou-se o filtrado. Para garantir a eliminação total do reagente de lavagem, repetiu-se a centrifugação por 2 minutos, descartando-se o filtrado final.

Quarta fase – Eluição de DNA da coluna *JetQUICK*: colocou-se as colunas num novo *ependorf* coletor de 1,5 mL e adicionou-se 40 µL de água esterilizada, pré-aquecida a 65 °C, diretamente no centro da matriz de sílica. Aguardou-se 5 minutos e procedeu-se a uma centrifugação final a 20000 g durante 2 minutos. O filtrado obtido continha DNA purificado, que foi guardado a -20 °C até uso. A coluna utilizada foi descartada.

Anexo 3

Relatório da empresa Nzytecn[®] referente à síntese do vetor de clonagem pUC57- Amp com o antígeno recombinante sintético multiepítipo

“Plasmids are delivered in ddH₂O (approximately 2 μg in 20 μL) and are pUC57 derivatives. Vector pUC57 is a common used plasmid cloning vector in *E. coli*. The vector length is 2,710 bp and is isolated from *E. coli* strain DH5a by standard procedures. Please use directly or use 0.2 μL of plasmid DNA to transform *E. coli* for propagation.”

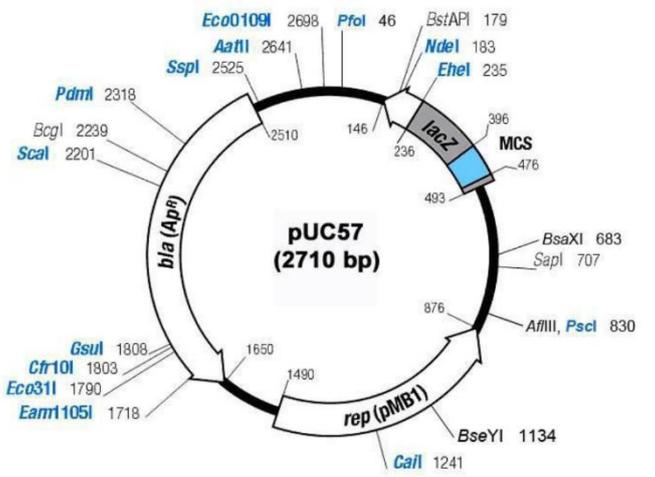


Figura A1. Vector pUC57



Figura A2. Cloning region

Gene name: IHMT_130298

>Escherichia coli Optimized Sequence Length:438, GC %: 52,13

GGCACCACCGAAATCCTGAAACAAGTCCTGCTGAATGAACATAAAGATACCCTGAAAGA
CCAAGAATCGTGTGTGAAATACCTGAAGGAAAAATGCAACAAGTGGAGTCGTCGCGGCA
ATGATCGTTTTTCCCTGGTGTGTGTTTTCTGGAAGGCGGTGGCGGTGGCGTCGCGGAA
GTGTTTGGCCGTTATGTTGGTCTGAAAGAACGCTGCAACAAGCTGGAAAGCGACTGCGG
TATTAAAGAAGATTGTAAGGACCTGGAAGGCGTCTGTGGTAAAATTCAGGGCGGCGGCG
GCGGCACCAGCACCATTACCTCTAAAATCACGCTGACCAGCACGCGTCGCTGCAAACCG
ACCAAGTGTACCACGGGCGATGACGCTGAAGATGTCAAGCCGTCTGAAGGTCTGAAAAT
GAGTGGTTGGTCCGTGATGCGTGCC

Protein name: IHMT_130298

>IHMT_130298_ami

GTTEILKQVLLNEHKDTLKDQESVKYLKEKCNKWSRRGNDRFSLVCFLEGGGGGVAE
VFGRYVGLKERCNKLESDCGIKEDCKDLEGVCGKIQGGGGGTSTITSKITLTSTRCKP
TKCTTGDDAEDVKPSEGLKMSGWSVMRG

Anexo 4

Protocolo – Isolamento de DNA plasmídico recorrendo ao *OIAprep Spin Miniprep* Kit da *OIAGEN*[®]

Primeira fase - Lise celular: em primeiro lugar, procedeu-se à centrifugação da cultura bacteriana a 8000 g durante 10 minutos numa centrífuga refrigerada a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuscitado em 250 µL de tampão de lise P1, num *ependorf* de 2 mL. Recorreu-se ao *vortex* para homogeneização da solução, de modo a não se observar agregados de células no final deste passo. Finalizada a homogeneização, adicionou-se 250 µL do tampão de lise P2 ao *ependorf* e este foi invertido quatro a seis vezes, num período máximo de 5 minutos. Neste tempo, obteve-se uma solução viscosa à qual se adicionou 350 µL de tampão N3. O *ependorf* sofreu novamente inversão por quatro a seis vezes, tendo ficado a solução com aspeto turvo. Centrifugou-se durante 10 minutos a 13000 g e observou-se a formação de um sedimento branco e compacto. Somente o sobrenadante resultante, foi utilizado no seguimento do processo de isolamento de DNA plasmídico.

Segunda fase - Adsorção de DNA plasmídico à coluna de purificação: aplicou-se o sobrenadante obtido numa coluna *OIAprep* e centrifugou-se durante 60 segundos a 15000 g. O fluido resultante da centrifugação foi descartado e lavou-se a coluna com a adição de 500 µL de tampão PB, tendo a coluna sido novamente centrifugada nas condições anteriores. O fluido resultante voltou a ser descartado e lavou-se a coluna com 750 µL de tampão PE, seguida de nova centrifugação. Eliminou-se todo o fluido originado e a coluna sofreu uma centrifugação adicional de mais 60 segundos nas condições anteriores, por forma a remover todos os resíduos do tampão de lavagem, tendo-se descartado o fluido resultante.

Terceira fase - Eluição de DNA plasmídico da coluna de purificação: colocou-se a coluna com o DNA plasmídico adsorvido na sua membrana de sílica num novo tubo *ependorf* de 1,5 mL, e o DNA plasmídico foi eluído pela adição, no centro da coluna, de 50 µL de tampão EB (10 mM TrisCl₂, pH 8,5). Deixou-se repousar a coluna durante

5 minutos com o tampão de eluição e, por fim, centrifugou-se durante 60 segundos a 15000 *g*, tendo o DNA plasmídico ficado no tubo *ependorf* de 1,5 mL.

Anexo 5

Elementos genéticos constituintes do vetor pLATE 31 e suas funções

Quadro A1. Elementos genéticos constituintes do vetor pLATE 31 e suas funções.

Constituinte	Função
bla (Ap^r)	Gene da β -lactamase que confere resistência à ampicilina. Útil na seleção e manutenção das colónias transformadas em cultura.
T_{rrnBT1-T2}	Terminador da transcrição que previne a expressão basal do gene a partir dos promotores dos elementos do vetor.
Lac0	Operão lac que controla a expressão do gene.
P_{T7}	Promotor da RNA polimerase T7 que dirige a transcrição do gene clonado.
RBS	Local de ligação do ribossoma para uma tradução efetiva do gene clonado.
6xHis	Cauda C-terminal de histidinas
P_{tet}	Promotor P _{tet} que reduz a expressão basal pelo promotor T7.
T_{T7}	Terminador da transcrição pelo promotor T _{T7} .
Lacl	Repressor que faz o controlo da expressão basal pelo promotor T _{T7} .
Rop	Proteína que regula o número de cópias do plasmídeo.
rep (pMB1)	Origem de replicação do plasmídeo pMB1

Anexo 6

Protocolo – Eletroforese de proteínas SDS-PAGE recorrendo ao *Mini-PROTEAN*[®] *Electrophoresis Cell* da *Biorad*[®] e ao aparelho *EC4000P* da *Apparatus Corporation*[®]

Para a realização de uma eletroforese de proteínas SDS-PAGE, foi necessário proceder à preparação de um gel de resolução e de um gel de concentração.

Neste trabalho, o gel de resolução foi preparado de modo a se obter um gel com 15 % acrilamida, 0,375 M Tris e pH 8,8 e 15 %, conforme ilustrado no quadro A2. O gel de concentração foi preparado conforme recomendação do fabricante para obtenção de um gel com 4 % acrilamida, 0,125 M Tris e pH 6,8, conforme ilustrado no quadro A3.

Quadro A2. Composição da mistura do gel de resolução.

Componente	Volume utilizado por gel
Água desionizada	2,350 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
10 % SDS	0,100 mL
30 % Acrilamida/Bis	5 mL
10 % Persulfato de amonia	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

Quadro A3. Composição da mistura do gel de concentração.

Componente	Volume utilizado por gel
Água desionizada	3,05 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 mL
10 % SDS	0,05 mL
30 % Acrilamida/Bis	0,665 mL
10 % Persulfato de amónia	0,05 mL
TEMED	0,01 mL

Para a realização desta técnica foi necessário preparar um tampão de eletroforese (0,25 M Tris, 1,92 M glicina, 1 % SDS), uma solução corante (2 g reagente azul *coomassie*, 100 mL ácido acético, 475 mL etanol, 425 mL de água) e uma solução descorante (80 mL metanol, 20 mL ácido acético, 100 mL água).

Protocolo de eletroforese de proteínas por SDS-PAGE:

1. Preparou-se o sistema para fazer o gel;
2. Preparou-se o gel de resolução (15 % de acrilamida), pipetando imediatamente a solução entre as placas de vidro e sílica até uma altura de aproximadamente 6 cm. Colocou-se uma camada de 1 mL de água desionizada de forma a obter uma superfície plana. Deixou-se polimerizar;
3. Após polimerização, removeu-se a água adicionada com papel absorvente;
4. Preparou-se o gel de concentração (4 % de acrilamida), pipetando imediatamente a solução entre as placas de vidro no volume restante, colocando-se de seguida o pente. Deixou-se polimerizar;
5. Montou-se o sistema de eletroforese e preencheu-se os tanques com tampão de eletroforese (1x);
6. Preparou-se as amostras para aplicação no gel, juntando 20 μ L de cada uma com 5 μ L de tampão. Aqueceu-se as amostras com tampão durante 5 minutos a 90 °C e arrefeceu-se de seguida em gelo, tendo-se repetido o processo três vezes;
7. Aplicou-se 15 μ L de amostra em cada poço e procedeu-se à eletroforese aplicando uma voltagem constante de 200 V, durante 1 hora. Um marcador de peso molecular foi aplicado (*Roti[®]-Marker standard* da *Carl Roth*);
8. Retirou-se o gel e colocou-se em 50 mL de uma solução corante. Deixou-se corar durante 3 horas.
9. Colocou-se o gel numa solução descolorante que atuou durante 3-5 horas. Findo este tempo, as bandas das proteínas eram visíveis.

Quando necessário, realizou-se a diálise das amostras antes da sua eletroforese por SDS-PAGE. Preparou-se uma solução de diálise (20 mM Tris-HCl pH 6,8) e deixou-se as amostras em contacto com esta solução, separadas por uma membrana de diálise adequada (D-0655 da Sigma[®]), em incubação durante 18 horas à temperatura ambiente.

Anexo 7

Protocolos – Processamento das amostras biológicas para diagnóstico de Pneumocistose

Processamento de amostras de expetoração induzida (EI): em primeiro lugar, à amostra, adicionou-se igual volume de um agente químico mucolítico, o DTT a 0,1 %, capaz de solver e solubilizar as partículas e agregados de muco presentes. Fez-se uma agitação vigorosa no *vortex*, durante 15 segundos, até homogeneização da amostra, e incubou-se a 37 °C durante 30 minutos. Caso a amostra se mostrasse mais mucosa do que o habitual, a quantidade do agente mucolítico e/ou o tempo de incubação foram ajustados, por forma a remover todo o muco presente. Num segundo passo, transferiu-se a solução para um tubo *falcon* de 15 mL e adicionou-se igual volume de tampão fosfato salino (PBS do inglês *phosphate buffered saline*), 150 mM com pH 7,2 (Sigma®), centrifugando-se a 5000 g, durante 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 0,5 mL de PBS. Este tampão PBS comportou-se como um estabilizante que, juntamente com a centrifugação, auxiliou na concentração das células de *P. jirovecii* presentes no sedimento. Por fim, com o sedimento ressuspendido, fez-se cinco esfregaços, com aproximadamente 10 µL de amostra cada, em lâminas de microscopia pré-tratadas com poli-L-lisina, o que auxiliou a aderência das células à lâmina. Deixou-se secar estes esfregaços à temperatura ambiente e, quando secos, fixou-se em acetona, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os que não seguiram para o diagnóstico parasitológico, foram armazenados a -20 °C para posterior estudo ou diagnóstico de confirmação. A restante amostra foi dividida em *eppendorfs* de 1,5 mL e foi guardada a -80 °C, de modo a conservar intacto todo o material biológico.

Processamento de amostras de lavado broncoalveolar (LBA): o processamento destas amostras foi semelhante ao das EI. No entanto, como estas amostras têm quantidades reduzidas de muco, o processamento iniciou-se na sua transferência direta para tubos *falcon* de 15 mL. O volume do tubo foi completado com PBS, e a amostra homogeneizada foi posta a centrifugar a 5000 g durante 20 minutos. Finda a centrifugação, removeu-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o sedimento em 0,5 mL de PBS. A partir deste ponto, o procedimento foi igual ao indicado para as amostras de EI.

Protocolo de processamento de amostras sanguíneas (sangue): As amostras sanguíneas chegaram ao laboratório como amostras de sangue total, colhidas por punção venosa em tubos de plástico desprovidos de anticoagulante. Após a retração do coágulo, centrifugou-se a 3500 g durante 10 minutos para obtenção do soro. Separou-se o soro obtido em alíquotas para *eppendorfs* estéreis de 1,5 mL, onde foi armazenado e conservado a -20 °C. Aquando da sua utilização, as amostras foram descongeladas a 4 °C e agitadas no *vortex*.

Anexo 8

Protocolo – Detecção de *Pneumocystis jirovecii* em espécimes pulmonares por imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM) através do Kit MonoFluo® *P. jirovecii* da BioRad®

Numa primeira utilização deste *kit*, procedeu-se à reconstituição da enzima, adicionando-se 250 µL de ácido clorídrico (HCl), 0,001 M, à enzima concentrada, misturando bem a solução. A enzima referida é a tripsina, uma enzima pertencente à família das proteases séricas.

O protocolo iniciou-se com a digestão enzimática da camada mais exposta da parede celular dos quistos de *P. jirovecii*, o que permitiu a exposição dos antigénios de superfície reconhecidos pelos anticorpos monoclonais utilizados. Nesta primeira fase, a enzima foi diluída (1:10) em tampão de diluição específico, constituído por tampão Tris com ativador enzimático, fornecido pelo fabricante, perfazendo um volume total de 20 µL. Posteriormente, os 20 µL de enzima diluída foram espalhados sobre a totalidade do esfregaço. Foi feita a incubação da lâmina em câmara húmida a 37 °C durante 30 minutos, sendo que o tempo foi rigorosamente respeitado por forma a não ocorrer sobredigestão ou subdigestão das paredes quísticas. Findo o período de incubação, a lâmina foi lavada cuidadosamente com água destilada e posta a secar à temperatura ambiente.

Depois de seca, procedeu-se à aplicação de 20 µL de anticorpo monoclonal. A lâmina foi posta novamente a incubar em câmara húmida a 37 °C, durante 15 minutos, por forma a se dar a ligação dos anticorpos específicos, produzidos e purificados a partir de rato, aos respetivos antigénios, caso presentes.

Terminada a incubação, repetiu-se o processo de lavagem e secagem da lâmina, após o qual se adicionou 20 µL de conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ao esfregaço. A lâmina foi posta a incubar em câmara húmida durante 15 minutos a 37 °C, lavada com água destilada, deixando-se secar à temperatura ambiente. Este conjugado consiste num anti-anticorpo (IgM) conjugado com isotiocianato de fluoresceína, o qual vai reagir e ligar-se ao anticorpo que já se encontra ligado aos antigénios de superfície do *P. jirovecii*.

A lâmina foi observada em microscópio de fluorescência. Para tal, a preparação foi montada recorrendo ao meio de montagem fornecido (glicerina tamponada) e a uma

lamela, ficando pronta para ser observada ao microscópio ótico de fluorescência no comprimento de onda de 475 nm. A fluoresceína, quando exposta a luz neste comprimento de onda, emite fluorescência de cor verde característica, o que permitiu visualizar os quistos de *P. jirovecii*, quando presentes. Estes quistos foram então identificados com base na fluorescência e nas suas características morfológicas. Uma preparação contendo mais de um quisto foi dada como positiva, enquanto um teste que apresentasse somente um quisto fluorescente foi considerado inconclusivo, exigindo repetição do mesmo.

Anexo 9

Protocolo – Extração de DNA de *P. jirovecii* das espécimes pulmonares através do mini kit QIAamp da QIAGEN®

Este *kit* traz um protocolo de extração adequado a amostras de fluidos corporais, que compreende os seguintes passos:

Lise celular dos quistos e/ou trofozoítos de *P. jirovecii*: adicionou-se 20 µL de proteinase K a 200 µL de amostra, previamente homogeneizada, num *ependorf* de 1,5 mL. Seguiu-se a adição de 200 µL de tampão de lise (AL) à amostra, homogeneizando-se a mistura no *vortex* durante 15 segundos. Esta mistura sofreu, de seguida, uma incubação a 56 °C durante 10 minutos, numa placa térmica. Findo o período de incubação, o *ependorf* sofreu um *short spin*. De seguida, adicionou-se 200 µL de etanol (96-100 %) à mistura reacional, homogeneizando-se novamente no *vortex* durante cerca de 15 segundos, recuperando-se todo o material através de um novo *shot spin*. A quantidade de etanol adicionada foi ajustada à quantidade de amostra utilizada. Este passo permitiu solver completamente o material orgânico contaminante.

Adsorção de DNA: a amostra foi aplicada numa das colunas *QIAamp* previamente colocada num *ependorf* coletor de 2 mL. Fez-se a centrifugação da coluna a 6000 g durante 1 minuto, com a tampa fechada, e descartou-se o primeiro *ependorf* coletor e o seu conteúdo. O DNA de interesse encontrava-se agora adsorvido na coluna *QIAamp*.

Lavagem das colunas: Colocou-se a coluna num novo *ependorf* coletor (2 mL) e adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem (AW1). Fechou-se a tampa da coluna e voltou-se a centrifugar nas condições expostas no ponto anterior. O *ependorf* coletor utilizado foi descartado e a coluna colocada num novo *ependorf* coletor de 2 mL. De seguida, procedeu-se à adição de 200 µL de outro tampão de lavagem (AW2) e a coluna foi centrifugada à velocidade máxima (20000 g) durante 3 minutos. Por forma a garantir que se eliminavam todos os resíduos deste último tampão de lavagem, a coluna foi colocada em novo *ependorf* coletor de 2 mL e novamente centrifugada à velocidade máxima por 1 minuto. Descartou-se o *ependorf* coletor e colocou-se a coluna num *ependorf* estéril de 1,5 mL.

Eluição de DNA: À coluna adicionou-se 200 µL de tampão de eluição (AE), o que permitiu a eluição de DNA da coluna. Incubou-se a coluna à temperatura ambiente (15-25 °C) durante 5 minutos e depois recuperou-se o DNA para um *epENDORF* estéril de 1,5 mL, centrifugando a coluna a 8000 g durante 1 minuto.

Os *epENDORFs* foram devidamente identificados e guardados a uma temperatura de - 20 °C até posterior uso.

Anexo 10

Protocolo – Amplificação do gene *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii* por PCR-nested

Esta técnica foi composta por duas fases distintas de amplificação, com a utilização de dois conjuntos de *primers*, em que a sequência alvo da segunda amplificação se encontrava inserida na primeira. Assim, o conjunto de *primers* mais externo proporcionou a 1ª parte da reação de amplificação enquanto o outro, mais interno, permitiu a 2ª parte, sendo que ambos abrangem a sequência de DNA a amplificar. Os *primers* utilizados e suas respectivas sequências estão descritos no quadro A4.

O produto final de amplificação consistiu num fragmento de DNA de 263 pares de bases (pb).

Quadro A4. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do gene *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii* por PCR-nested e respectivas dimensões dos fragmentos de amplificação que originam.

PCR	Primer	Sequência do Primer	Ampliação
1ª parte (<i>primer</i> exterior)	pAZ 102-E	(5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3')	346 pb
	pAZ 102-H	(5'-GTGTACGTTGCAAAGTACTC-3')	
2ª parte (<i>primer</i> interior)	pAZ 102-X	(5'-GGTATAGCACTGAATATCTC-3')	263 pb
	pAZ 102-Y	(5'-AATTACTGTTCTGGGCTGTT-3')	

Por cada amostra, preparou-se uma primeira mistura reacional (1ª amplificação), contendo tampão de reação 1x (67 mM Tris-HCl [pH 8,8], 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01 % *tween-20*; *Bioline*[®]), 0,8 mM de uma mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Applied Biosystems*[®]), 0,75 unidades (U) de enzima de polimerização *Biotaq*[™] DNA polimerase (*Bioline*[®]), 0,2 µM de cada *primer* externo (pAZ 102-E e pAZ 102-H; *MWG Biotech*[®]), 2,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (*Bioline*[®]), 0,01 µg/µL de albumina sérica bovina (BSA) (*Sigma*[®]), 2 µL de amostra de DNA genómico e, por fim, água destilada estéril até perfazer o volume de 50 µL.

Para a 2ª amplificação, foi feita nova mistura reacional que foi preparada nas mesmas condições que a primeira, com exceção dos *primers* utilizados, sendo que nesta 2ª fase foram utilizados 0,2 µM de *primers* internos (pAZ 102-X e pAZ 102-Y; *MWG*

Biotech[®]). À mistura foram adicionados 2 µL de DNA amplificado na primeira reação de PCR.

Para monitorizar a qualidade dos resultados, em cada reação de amplificação utilizou-se um controlo positivo, constituído por uma suspensão de DNA de *P. jirovecii*, e um controlo negativo, que consistia em água desionizada estéril. Estes controlos substituíram, nas respetivas misturas reacionais, os 2 µL de DNA genómico das amostras.

Todo o protocolo decorreu numa câmara de fluxo laminar tendo os tubos de PCR sido transferidos para um termociclador (*Biometra*[®] *T1 Thermocycler*). As condições térmicas de amplificação, idênticas na 1^a e na 2^a parte da PCR-*nested*, estão descritas no quadro A5.

Quadro A5. Condições térmicas aplicadas na PCR-*nested* para amplificação específica do gene *mtLSUrRNA* de *P. jirovecii*.

Condições de amplificação	Nº de ciclos
Desnaturação inicial 95 °C → 3 minutos	1
Desnaturação 95 °C → 1,5 minutos	40
Ligação 55 °C → 1,5 minutos	
Extensão 72 °C → 2 minutos	
Extensão final 72 °C → 10 minutos	1

O DNA amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2 %, para posterior avaliação dos produtos de amplificação. Aplicaram-se as amostras nos respetivos poços e a separação eletroforética foi efetuada a 60 V, durante 1 hora. As bandas com tamanho correspondente ao fragmento esperado (263 pb) foram consideradas positivas para a presença de DNA genómico de *P. jirovecii*.

