



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização genética da Glucano Sintetase de
Pneumocystis jirovecii

Rafaela Dorileo de Castro

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GRAU DE
MESTRE EM SAÚDE TROPICAL**

OUTUBRO, 2014



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização genética da Glucano Sintetase de *Pneumocystis jirovecii*

Autor: Rafaela Dorileo de Castro

Orientador: Professor Doutor Jorge Francisco Gaspar

Co-orientadora: Professora Doutora Olga Matos

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Tropical.

Financiado pelo Projeto PTDC/SAU-MII/104231/2008 (The Role of β -glucan in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia (PcP): A new diagnostic tool).

No âmbito desta dissertação foi apresentada uma comunicação em congresso internacional mencionada abaixo:

- 1) **Rafaela Castro**, Susana N. Silva, Francisco Esteves, Olga Matos, Jorge F. Gaspar. **Caracterização genética da (1,3)-Beta-D-glucano Sintetase de *Pneumocystis jirovecii***. 1º encontro ibero-americano e dos países de língua oficial portuguesa sobre *Pneumocystis* e Pneumocistose, Lisboa, Portugal. (Outubro, 2013)

Dedicatória

À Deus, que me deu o poder da fé inabalável que me fez caminhar por estes anos com a certeza de traçar um caminho melhor.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional que tanto precisei.

Ao meu irmão, pela parceria nestes anos de aprendizado.

RESUMO

Caracterização genética da Glucano Sintetase de *Pneumocystis jirovecii*

Rafaela Dorileo de Castro

Pneumocystis jirovecii é um micro-organismo fúngico que pode causar pneumonia em doentes imunocomprometidos. O ciclo de vida de *Pneumocystis* inclui uma forma biológica trófica e outra quística na qual estão presentes, em sua composição, hidratos de carbono chamados β -Glucanos. Estes componentes são liberados na corrente sanguínea após lise do micro-organismo pela resposta imunitária ou fármacos, sendo assim, considerado um marcador sorológico que atua como auxiliar no diagnóstico da PPc. Porém, este marcador não é específico para o gênero *Pneumocystis*, podendo ser um teste positivo em outras infecções fúngicas como a candidíase. Caracterizar a sequência genética da Glucano Sintetase permite uma nova abordagem em relação aos testes sorológicos e a possíveis novos alvos terapêuticos. Um teste sorológico para o β -Glucano específico para *P. jirovecii* podendo ser um marcador muito mais útil e confiável do que os utilizados atualmente. Neste trabalho foi feita a caracterização genética do fragmento correspondente à Glucano Sintetase de *P. jirovecii* com base na sequência de β -Glucano de *P. carinii* e na sequência completa de *P. jirovecii* através de metodologias de PCRs. Com o resultado do sequenciamento do fragmento de β -Glucano de *P. jirovecii* puderam ser observadas possíveis bases candidatas a polimorfismos de base única (SNP). Determinar os polimorfismos em uma sequência resulta em conhecimento da diversidade genética do micro-organismo para além de reconhecer marcadores moleculares que podem determinar sua origem geográfica, resistência a fármacos e fatores de virulência. Duas bases foram identificadas na sequência como possíveis SNPs. Estudos em projetos futuros com técnicas como o RFLP podem caracterizar e determinar as consequências e importância destes polimorfismos no fragmento da Glucano Sintetase de *P. jirovecii*. Estabelecer esta importância pode levar à compreensão do modelo de infecção e defesa deste micro-organismo para que possamos perceber melhor sua atuação.

Palavras-chaves: *Pneumocystis jirovecii*, sequenciação, polimorfismo de base única

ABSTRACT

Genetic characterization of Glucan Synthase of *Pneumocystis jirovecii*

Rafaela Dorileo de Castro

Pneumocystis jirovecii is a fungal micro-organism that can cause pneumonia in immunocompromised patients. The life cycle of *Pneumocystis* includes two biologic forms, trophic and cystic, in which are present in its composition, carbohydrates called β -Glucans. These components are released into the blood after lysis of the microorganism by drugs or immune response, therefore, considered a serological marker that acts as an aid in the diagnosis of PcP. But today, this marker is not specific for *jirovecii* species and can be a positive test for other fungal infections such as candidiasis. Characterize the genetic sequence of Glucan Synthase allows a new approach to serological tests and possible new therapeutic targets. A serological test for specific β -Glucan for *P. jirovecii* is much more useful and reliable than the currently used marker. In this work the genetic characterization of the fragment corresponding to the Glucan Synthase of *P. jirovecii* was made based on the sequence of β -glucan of *P. carinii* and the complete sequence of *P. jirovecii* by PCR methodologies. With the result of the sequencing of the β -glucan fragment from *P. jirovecii* possible candidate bases were observed at single nucleotide polymorphisms (SNP). Determine polymorphisms in a sequence results in knowledge of the genetic diversity of the micro-organism in addition to recognizing molecular markers that determine their geographical origin, drug resistance and virulence factors. Two bases were identified following SNPs as possible. Studies on future projects with techniques such as RFLP may characterize and determine the consequences and significance of these polymorphisms in the Glucan Synthase of *P. jirovecii* fragment. Establish this importance can lead to understanding of infection and defense of this micro-organism model so that we can better understand its performance.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, sequencing, single base polymorphism.

Índice Geral

Dedicatória.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	x
Lista de abreviaturas	xi
1. Introdução.....	1
1.1. <i>Pneumocystis</i>: Aspecto histórico	1
1.2. Fundamentos taxonômicos e nomenclatura.....	2
1.3. Biologia do <i>Pneumocystis</i>.....	4
1.4. Genoma	6
1.5. Ciclo de vida.....	7
1.6. Heterogeneidade.....	10
1.7. Pneumonia por <i>Pneumocystis</i> (PPc).....	12
1.7.1. A infecção	12
1.7.2. Resposta imunitária	15
1.8. Identificação laboratorial	18
1.9. Tratamento e profilaxia.....	21
2. Célula fúngica.....	23
2.1. β-Glucano.....	24
2.2. A importância do β-(1,3)-glucano como marcador na clínica	27
3. Objetivos.....	30
3.1. Objetivos gerais	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. Material e métodos	31
4.1. Dados das amostras e população em estudo	31
4.2. Processo bioinformático e desenho de primers.....	31
4.3. LongRange PCR	33
4.4. Sequência genética para <i>Pneumocystis jirovecii</i>	34
4.4.1. Processo bioinformático e desenho de primers.....	34
4.4.2. Amplificação por PCR.....	35

4.5.	Monitorização em gel de agarose	37
4.6.	Sequenciação	38
5.	Resultados e Discussão.....	39
5.1.	Análise Bioinformática	39
5.1.1.	<i>P. carinii</i> X Outros micro-organismos semelhantes	39
5.1.2.	Bioinformática a partir de nova análise da sequência genética de <i>P. jirovecii</i>	40
5.1.3.	Análise comparativa da sequência obtida (BLAST)	43
5.1.4.	Análise da sequência proteica resultante da sequenciação	46
5.2.	Otimizações e resultados da LongRange PCR.....	53
5.3.	Resultados das reações de PCR.....	56
6.	Conclusões	60
7.	Referências Bibliográficas	64
8.	Anexos.....	73

Índice de Figuras

Figura 1: Taxonomia do micro-organismo <i>Pneumocystis</i> (Adaptado de Cushion & Stringer 2010).	3
Figura 2: Esquema de visualização das estruturas de um trofozoíto (de Souza & Benchimol 2005)	4
Figura 3: Esquema de visualização das estruturas de um quisto (de Souza & Benchimol 2005).....	5
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Pneumocystis jirovecii</i> (CDC). Na fase assexual as formas tróficas (1) se replicam por mitose. Na fase sexual as formas tróficas haplóides (1) conjugam e produzem um zigoto ou esporoquisto (quisto primário) (2). Esse quisto primário sofre meiose e subsequente mitose para produzir oito núcleos haplóides (quisto maduro) (3). Esse quisto maduro rompe libertando as células haplóides e depois se degrada. Na fase trófica também é reconhecido que há a multiplicação por fissão binária.....	8
Figura 5: Base de um β -glucano fúngico. A subunidade básica do β -glucano fúngico é composta por β -D-glicose ligadas umas às outras por cadeias glicosídicas 1->3 com braços glicosídicos 1->6 (Chan et al. 2009).....	24
Figura 6: Os β -Glucanos são capturados pelos macrófagos através do receptor dectin-1 com ou sem a ajuda do TLR-2/6. As moléculas de β -Glucano são internalizadas e fragmentadas em moléculas menores e então liberadas. Estes pequenos fragmentos serão eventualmente capturados pelos granulócitos, monócitos ou macrófagos circulantes via receptor complemento CR3 [Adaptado de (Chan et al. 2009)].....	25
Figura 7: Resultado do alinhamento da sequência do β -Glucano de <i>P. carinii</i> com outras possíveis sequências de micro-organismos semelhantes. O resultado foram 16 sequências de 8 espécies diferentes que se assemelham na ordem dos 70-90%.	32
Figura 8: Mapa dos fragmentos a serem amplificados a partir da sequência de bases obtidas (5994 pb) de acordo com os primers desenhados. Do Fw1 ao Rv1 foi feita uma amplificação onde se esperava um resultado de 2564 bp. Do Fw2 ao Rv2 foi feita uma segunda amplificação onde se esperavam 3360 bp amplificados. Notar que o Fw2 está posicionado antes do Rv1 para que pudesse abranger todas as bases de modo a não perder informação.....	33
Figura 9: Esquema de visualização do resultado de alinhamento das sequências no programa MultAlin onde podem ser vistas as espécies selecionadas para comparação que se assemelham ao β -Glucano de <i>P. carinii</i> . Na imagem podem ser notadas as bases semelhantes em vermelho e as diferentes em azul.	40

Figura 10: Imagem do resultado de pareamento (BLAST) entre a sequência descrita do β-Glucano de <i>P. carinii</i> e a nova sequência disponível do genoma de <i>P. jirovecii</i> (contig 236). Estas duas sequências se assemelham em 88% em cerca de 6000 bases.	41
Figura 11: Resultado do emparelhamento das sequências de β-Glucano de <i>P. carinii</i> e do contig 236 de <i>P. jirovecii</i> no programa MultAlin. Podem ser notadas as bases semelhantes em vermelho e as diferentes em azul.	42
Figura 12: Resultado do alinhamento entre a sequência obtida neste estudo e a disponível atualmente de <i>P.jirovecii</i> . O emparelhamento foi de 99%, ou seja, há uma identidade quase completa entre as duas sequências.	44
Figura 13: Resultado do alinhamento entre a sequência obtida neste estudo e outras sequências semelhantes disponíveis no GenBank.	45
Figura 14: Sequência de aminoácidos resultante da tradução de nucleotídeos do fragmento obtido neste estudo. Dessa tradução resultou uma sequência de 987 aminoácidos.....	46
Figura 15: BLASTP entre as sequências de aminoácidos da sequência obtida neste estudo e da sequência do β-Glucano de <i>P. carinii</i> . O resultado foi uma homologia de 90%.	47
Figura 16: BLASTP entre a sequência de aminoácidos obtida neste estudo e a sequência de <i>P. jirovecii</i> onde se encontra possivelmente localizado o β-Glucano.	48
Figura 17: Como resultado da procura de domínios conservados na sequência de nucleotídeos, obtiveram-se quatro regiões chamadas de FKS1 (1) e Glucano Sintetase(3). Os domínios encontrados são codificados pelos fragmentos situados entre posições indicadas em Interval para que possam ser localizadas na sequência.....	49
Figura 18: Imagem resultante da pesquisa de regiões conservadas na sequência do β-Glucano de <i>P. carinii</i> . Podem ser observadas as mesmas regiões conservadas da sequência elaborada neste estudo.	50
Figura 19: Resultado da procura por regiões conservadas no contig 236 de <i>P. jirovecii</i> entre as bases 34.984 à 40.978.	50
Figura 20: Representação do resultado do BLASTP do 1,3-β-D-Glucano de <i>S. cerevisiae</i> (UniProtKB/Swiss-Prot: P38631.2).	51
Figura 21: O resultado da amplificação de dois fragmentos visualizados aqui em gel de agarose mostra as bandas pretendidas de 2.564 bp em A e de 3.360 em B. As duas imagens apresentam, para além das bandas pretendidas, outras bandas inespecíficas.	53

Figura 22: As bandas pretendidas puderam ser isoladas quando visualizadas em gel de agarose, mostrando assim a pureza das amostras para que pudessem ser enviadas para sequenciamento sozinhas.....	54
Figura 23: Resultado do sequenciamento das amostras obtidas por LongRange PCR. O resultado não se mostra satisfatório pois eram esperadas seqüências maiores do que as apresentadas. Porém, o resultado era esperado visto as dificuldades de sequenciamento de amostras provenientes de corte em gel.....	55
Figura 24: Mapa ilustrando as posições das seqüências 7, 10 e 11 com base na seqüência de 5994 bases.....	56
Figura 25: Mapa global das seqüências amplificados. Cada seqüência está representada por um número em série na linha que representa a seqüência de bases e suas posições de acordo com a seqüência obtida na bioinformática como referência à possível posição do β -glucano de <i>P. jirovecii</i> . Foram amplificados um total de 12 seqüências sendo que suas posições representam a seqüência amplificada com início no <i>primer</i> escolhido <i>forward</i> e fim no <i>primer reverse</i>	57

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Taxonomia do micro-organismo <i>Pneumocystis</i> (Adaptado de Cushion & Stringer 2010)	2
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> desenhados para amplificação da sequência completa.	33
Tabela 3: Sequência dos <i>primers</i> desenhados para fazer a amplificação da sequência em fragmentos de cerca de 500 pb cada.....	35
Tabela 4: Condições dos ciclos de PCR utilizados para cada kit.....	36
Tabela 5: Quantificação de DNA em cada amostras pelo sistema Nanodrop.....	38
Tabela 6: Quantidade de pares de base esperados para cada sequência amplificado de acordo com a posição de seus <i>primers</i>	57

Lista de abreviaturas

% - percentagem

°C – grau Celsius

5'->3' – Sentido de orientação da sequência nucleica

α - Alfa

A-aO₂ - Gradiente arterial alveolar

AcM – Anticorpo monoclonal

ATP – Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)

β - Beta

BG – β -Glucano

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTP – do inglês *Protein BLAST*

CDC – Centers for disease control

DHFR – Dihidrofolato redutase

DHPS – do inglês *dihydropteroate synthase*

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *desoxyribonucleic acid*)

dNTP – Desoxirribonucleicos trifosfatado (do inglês *deoxyribonucleotide triphosphate*)

Fw - *Forward*

g – Gramas

GC – Guanina e Citosina

HIV – do inglês *human immunodeficiency virus*

ICBN – Código internacional de nomenclatura botânica

ICZN – Comitê internacional de nomenclatura zoológica

IF - Imunofluorescência

IFN – do inglês *interferon*

Ig - Imunoglobulinas

IL - Interleucina

ITS - Espaçadores internos transcritos (do inglês *internal transcribed spacer*)

Kb – Kilo bases

LBA – Lavado broncoalveolar

LDH – do inglês *serum lactate dehydrogenase*

μ - microlitro

Mb – Mega bases

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

ml - mililitro

MSG – do inglês Major surface glycoprotein

mt DNA – DNA mitocondrial

mt LSU rRNA – Subunidade maior do rRNA mitocondrial (do inglês *mitochondrial large-subunit rRNA*)

mt SSU rRNA – Subunidade menor do rRNA mitocondrial (do inglês *mitochondrial small-subunit rRNA*)

MultAlin – do inglês *Multiple sequence alignment*

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio

pb – pares de base

PCR – do inglês *Polymerase chain reaction*

PFGE – do inglês *pulsed field gel eletrophoresis*

PPc – Pneumonia por *Pneumocystis*

RNA – Ácido ribonucleico

rRNA – RNA ribossomal

Rv - *Reverse*

Sida – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SMZ - Sulfametoxazol

SNP – Polimorfismo de base única (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)

TARVc – terapêutica antiretroviral de combinação

TCD4+ - Linfócito T com receptores de agrupamento de diferenciação 4

TLR – do inglês *Toll-like receptor*

TMP - Trimetoprim

TS – Timidilato sintase

1. Introdução

1.1. *Pneumocystis*: Aspecto histórico

Em 1909, Carlo Chagas descreve a forma quística de um micro-organismo observado por microscopia ótica ao estudar cobaias infectadas por *Trypanosoma cruzi*, chegando a relacioná-lo erroneamente com este protozoário. Um ano mais tarde Antonio Carinii observa as mesmas descrições de formas quísticas em pulmões de ratos infectados por *T. cruzi* mas põe a hipótese de se tratar de uma nova espécie. Apenas em 1912 é que o casal Delanoe confirma que de fato o micro-organismo em questão era referente a uma espécie diferente, ao observá-los em pulmões de ratos não infectados por *T. cruzi*. Então concluíram que se tratava de uma nova entidade biológica e denominaram-no *Pneumocystis carinii*. “*Pneumo*” em relação ao tropismo para os pulmões, “*cystis*” pela forma típica quística e “*carinii*” em homenagem a Antonio Carinii (Stringer 1996; de Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis et al. 2008).

A importância clínica de *Pneumocystis* começa a surgir na década de 1960 do século XX. Nessa década são descobertos vários casos de pneumonia em crianças malnutridas, com imunodeficiência, e em doentes com câncer ou transplantados. Já na década de 1980 do mesmo século, no início da epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (Sida), *Pneumocystis* volta a ganhar destaque como sendo a principal infecção oportunista no contexto dessa imunodeficiência e, com isso, ganha maior atenção da parte da comunidade científica. Um declínio da incidência das infecções oportunistas, nomeadamente, da pneumonia por *Pneumocystis* (PPc), deu-se após a introdução da terapêutica antirretrovírica de combinação (TARVc), já em meados da década de 90 do século passado (Helweg-Larsen 2004; de Souza & Benchimol 2005).

1.2. Fundamentos taxonômicos e nomenclatura

Durante muito tempo *Pneumocystis* foi considerado um protozoário devido à sua semelhança morfológica com os protozoários, ausência de algumas características fúngicas, ineficácia perante fármacos antifúngicos e eficácia dos fármacos utilizados contra protozoários. Hoje, está estabelecido como um fungo no filo dos ascomicetos contendo espécies específicas de hospedeiro sendo cinco delas bem estabelecidas (Tabela 1). Algumas das evidências que comprovam sua colocação no reino fúngico são as análises filogenéticas baseadas no seu RNA ribossomal (rRNA) e sequências do gene mitocondrial, que demonstraram homologias significativas com sequências de DNA fúngico. (Stringer et al. 2002; Beck & Cushion 2009; Cushion & Stringer 2010; Chabé et al. 2011).

Tabela 1 - Taxonomia do micro-organismo *Pneumocystis* (Adaptado de Cushion & Stringer 2010)

Esquema taxonômico	Classificação
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Taphrinamycotina
Ordem	Pneumocystidales
Classe	Pneumocystidomycetes
Família	Pneumocystidaceae
Gênero	<i>Pneumocystis</i>
Espécies	<i>jirovecii</i> , <i>carinii</i> , <i>wakefieldiae</i> , <i>murina</i> , <i>oryctolagi</i>

A mudança taxonômica do *Pneumocystis* de protozoário para fungo originou também mudanças em sua nomenclatura. *P. carinii* foi originalmente classificado como protozoário e seu nome foi determinado de acordo com as normas do comitê Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN). O nome de um fungo é regido pelas normas do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (ICBN) (Cushion & Stringer 2010). Em 2002, após reconhecimento de sua distinção funcional e genética para o *P. carinii*, o *Pneumocystis* que infecta os humanos, antes designado de *Pneumocystis carinii f.sp hominis*, passa a se chamar *Pneumocystis jirovecii* em homenagem a Otto Jirovec. (Helweg-Larsen 2004; Cushion & Stringer 2010)

Quando se fez o sequenciamento de certos genes do *Pneumocystis*, percebeu-se a sua homologia com genes de outros fungos ao invés de protozoários. Genes como 16-S-like rRNA, DHFR (Dihidrotolase redutase), TS (Timidilato sintetase), β -tubulina, proteína TATA e P-type cation-translocating ATPase, têm sido utilizados no estudo de *Pneumocystis* (Figura 1) (Cissé et al. 2012).

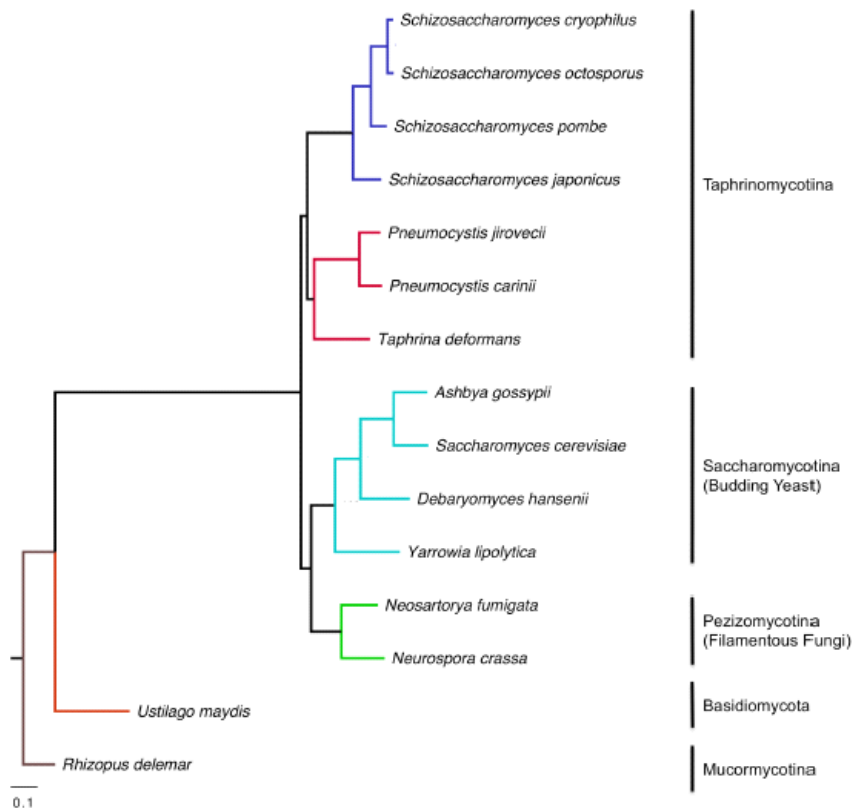


Figura 1: Taxonomia do micro-organismo *Pneumocystis* (Adaptado de Cushion & Stringer 2010)

1.3. Biologia do *Pneumocystis*

No pulmão, duas formas principais podem ser identificadas: o trofozoíto e o quisto (Helweg-Larsen 2004)

O trofozoíto (Figura 2) é a forma mais abundante nos pulmões de doentes com PPc. O trofozoíto possui forma variável, medindo cerca de 0.3 μm de diâmetro e geralmente em grupos, tem grande afinidade pelos pneumócitos e se origina diretamente do quisto. O seu citoplasma é pobre em organelas com predominância de ribossomas livres e partículas de glicogênio. Estruturas tubulares semelhantes a retículos endoplasmáticos, um pequeno núcleo e nucléolo também são observados. Há também uma camada fina e densa que circunda o micro-organismo e parece estar envolvida na sua ligação ou nutrição. Possuem projeções citoplasmáticas conhecidas como filopodias, que ajudam na fixação ao pneumócito tipo I. Uma característica do organismo, por exemplo, é que em sua forma trófica ele possui uma parede frágil e flexível contendo Glicoproteínas. Estas formas são mais numerosas que os quistos nos pulmões, menores e não refratárias em microscopia (Stringer 1996; de Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis et al. 2009)

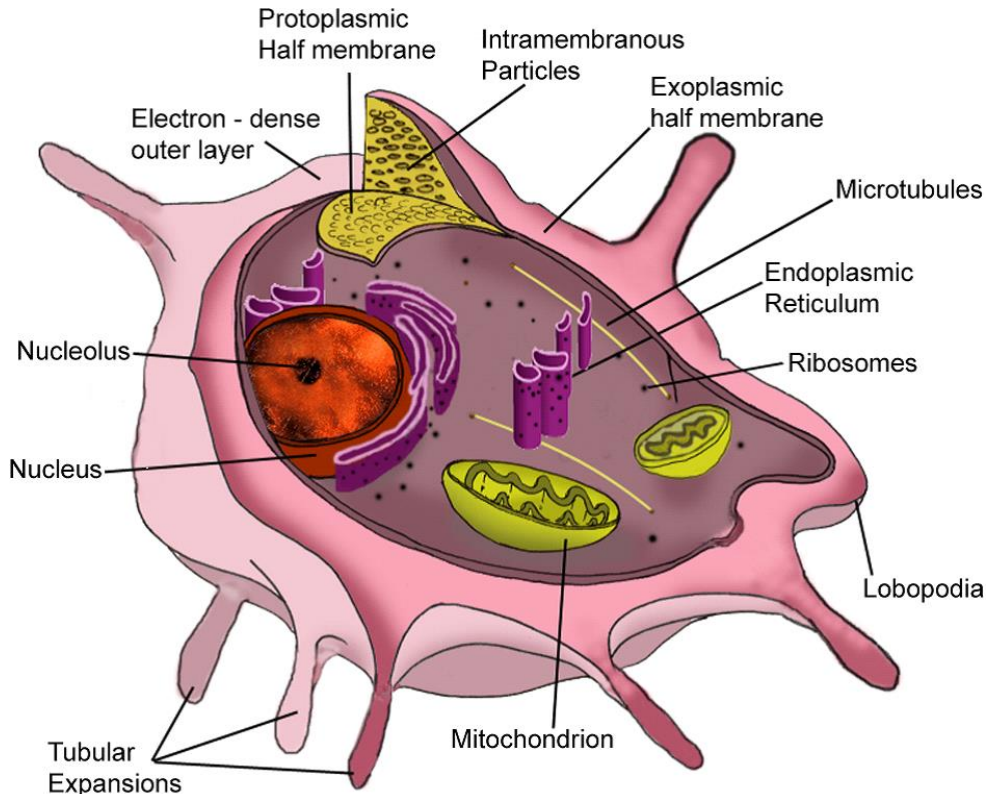


Figura 2: Esquema de visualização das estruturas de um trofozoíto (de Souza & Benchimol 2005)

Os quistos (Figura 3) são estruturas esféricas com cerca de 5-8 μm de diâmetro contendo até oito corpos intraquísticos. Cada quisto contém duas paredes com espessura de cerca de 50 nm, sendo a parede externa mais eletrodensa que a interna. A parede do quisto é composta por glicose/manose, galactose/resíduos, N-acetil-D-galactosamina, β -Glucano e Glicoproteínas. Cada corpo intraquístico irá dar origem a um trofozoíto após o desenquistamento (Helweg-Larsen 2004; de Souza & Benchimol 2005)

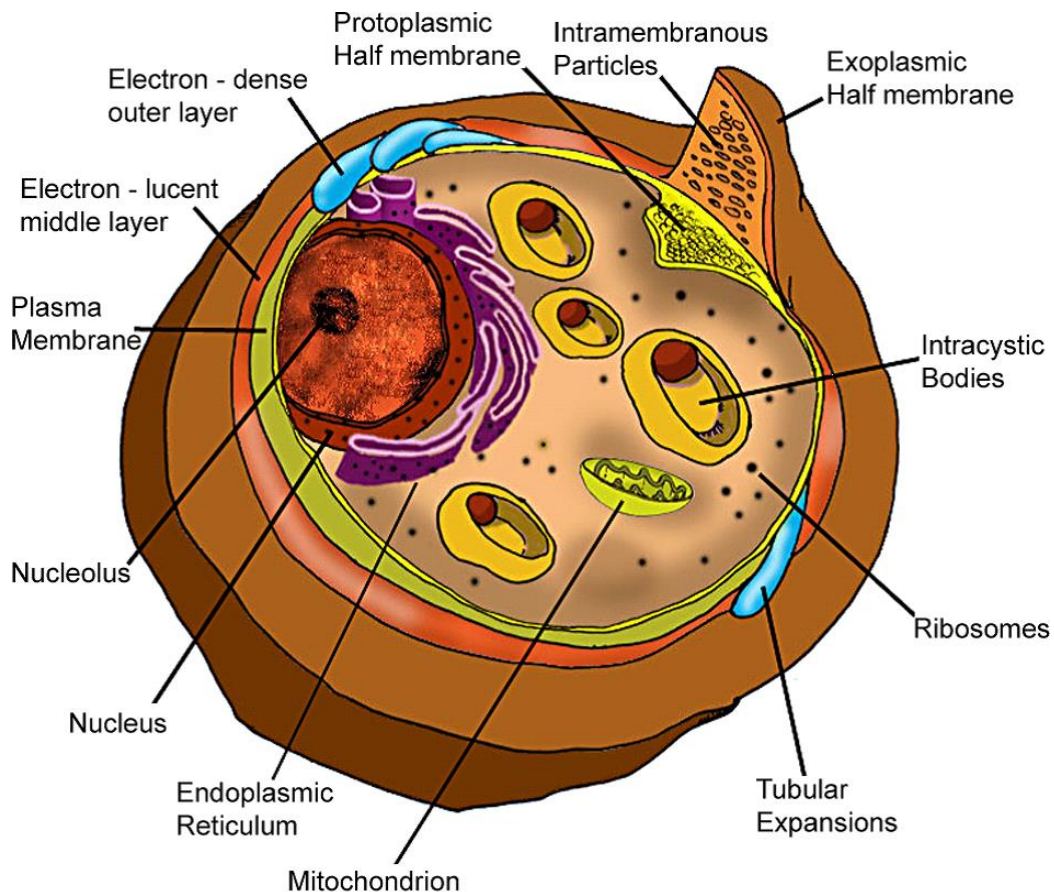


Figura 3: Esquema de visualização das estruturas de um quisto (de Souza & Benchimol 2005)

O micro-organismo, tanto na fase trófica quanto na fase quística, é coberto por proteínas de superfície de grande importância para a investigação. O maior componente é a proteína MSG (do inglês *Major Surface Glycoprotein*) que desempenha papel na interação entre o micro-organismo e o hospedeiro (Nakamura 1998).

1.4.Genoma

No início, toda a informação genômica a respeito do gênero *Pneumocystis* era baseada em informações obtidas ao estudar *P. carinii*. Com o desenvolvimento da técnica PFGE (do inglês *pulsed field gel electrophoresis*), pode-se ter uma noção do genoma deste micro-organismo. A técnica tem revelado cerca de 13 a 15 bandas, dependendo da colônia de ratos da qual *Pneumocystis* é extraído, com aproximadamente 8Mb (Stringer & Cushion 1998).

Porém, num estudo realizado por Cissé *et al.*, 2012 analisou-se a sequência genética de *P. jirovecii* através de uma amostra de Lavado Broncoalveolar (LBA) de um doente. O genoma deste micro-organismo parece ser de 8.1 Mb possuindo uma baixa percentagem de GC (29%) e um genoma menor do que de outros micro-organismos semelhantes como *Saccharomyces pombe*. O genoma mitocondrial possui 27 Kb (Cissé et al. 2012).

Antes do sequenciamento completo de *P. jirovecii*, alguns genes já haviam sido identificados. Entre eles o mitocondrial, citocromo b, e o gene da subunidade ribossomal maior (mt LSU rRNA) e menor (mt SSU rRNA) (Ma et al. 2013).

Curiosamente, a forma do genoma mitocondrial pode ser diferenciada mesmo em organismos correlacionados. No entanto essas diferenças ainda não estão muito bem estabelecidas quanto às suas propriedades. De acordo com estudos anteriores nas espécies de *Pneumocystis*, o genoma mitocondrial de *P. carinii* e de *Pneumocystis murina* tem estrutura linear, e o genoma mitocondrial de *P. jirovecii* parece ser circular. Sabendo que genomas lineares e circulares utilizam diferentes modos de replicação, o conhecimento de ambos em um mesmo gênero apresenta oportunidades de investigação, como o desenvolvimento de medicamentos específicos por exemplo. A presença de formas moleculares variantes de DNA mitocondrial (mtDNA) permite analisar as diferenças estruturais entre o mapeamento linear e circular de mtDNA, e colocar questões acerca da origem evolutiva e estratégias de replicação de *Pneumocystis* (Rycovska 2004; Kosa et al. 2006; Cushion & Keely 2013).

1.5.Ciclo de vida

O ciclo de vida de qualquer um dos membros do gênero *Pneumocystis* ainda não foi completamente definido principalmente devido à falta de um sistema de cultura *in vitro*. O ciclo conhecido atualmente é baseado em análise microscópica e estudos genéticos moleculares. Parece não haver uma forma livre do micro-organismo, evidenciando que este gênero é dependente do hospedeiro e não requer um vetor ou período de maturação fora dos pulmões (Cushion & Stringer 2010).

Ainda não está clara qual a forma infectante do micro-organismo, porém a transmissão via aérea é a mais aceita (de Souza & Benchimol 2005; Kelly 2013).

Em modelos animais a transmissão via aérea tem sido evidenciada através de experiências, com modelos imunocompetentes ou imunodeprimidos, com e sem PPc, habitando o mesmo ambiente. Argumentos emergem a favor de transmissão semelhante em humanos, com análises mostrando igualdade entre o genótipo de doentes com PPc ou doentes colonizados e agentes de saúde colonizados (Menotti et al. 2013).

Os dois principais estádios do ciclo são o trofozoíto e o quisto maduro (Figura 4). É importante ressaltar que todo o ciclo de vida e formas de desenvolvimento foram vistos em modelos animais e em poucos casos em culturas de células, sendo necessários mais estudos para se conhecer todo o ciclo de vida do *Pneumocystis* (de Souza & Benchimol 2005).

Após a inalação, a infecção se inicia quando as formas tróficas se fixam nos pneumócitos tipo I do hospedeiro (Cushion & Stringer 2010). Estes micro-organismos mantêm uma existência extracelular nos alvéolos pulmonares (Cushion et al. 2007).

Após o primeiro contato com a célula do hospedeiro, o trofozoíto modifica seu citoplasma para formar extensões, chamadas de filopodias, que aprofundam na membrana plasmática e ancoram o organismo às células (Su & Martin 1994).

Uma vez nos alvéolos, cachos de micro-organismos formam-se sob a forma trófica ancorados aos pneumócitos tipo I (Cushion et al. 2007).

Os trofozoítos iniciais são haplóides e se dividem por fissão binária ou endogamia. Dois trofozoítos podem-se conjugar dando origem a uma célula diplóide que depois se dividirá

através de meiose (de Souza & Benchimol, 2005). O processo de conjugação é iniciado após secreção mútua de ferormônios de dois tipos opostos (Aliouat-Denis et al. 2009).

As formas tróficas podem ser comparadas às leveduras vegetativas, sendo capazes de gerar quistos pela fusão de duas células haplóides seguido por divisões meióticas (Stringer 1996).

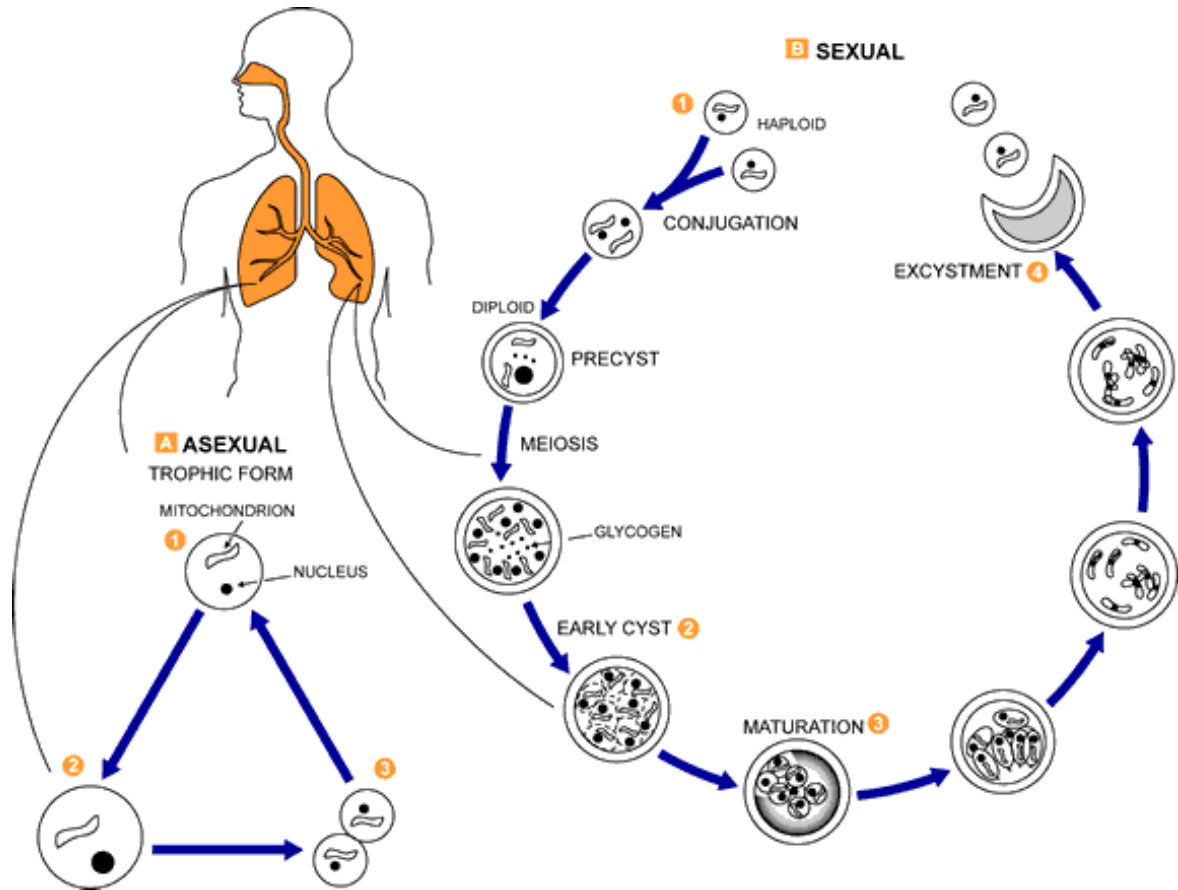


Figura 4: Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii* (CDC). Na fase assexual as formas tróficas (1) se replicam por mitose. Na fase sexual as formas tróficas haplóides (1) conjugam e produzem um zigoto ou esporoquisto (quisto primário) (2). Esse quisto primário sofre meiose e subseqüente mitose para produzir oito núcleos haplóides (quisto maduro) (3). Esse quisto maduro rompe libertando as células haplóides e depois se degrada. Na fase trófica também é reconhecido que há a multiplicação por fissão binária.

A meiose é seguida por um processo de mitose dando origem a oito corpos intraquísticos que amadurecem dando origem a oito trofozoítos. Enquanto este processo ocorre, uma outra camada aparece entre a camada electrodensa e a membrana plasmática do esporoquisto (forma primária do quisto durante o ciclo de vida de *Pneumocystis*), vai se afinando até formar a fina membrana que envolve o quisto maduro (de Souza & Benchimol 2005; Aliouat-Denis et al. 2009).

Além dos quistos e trofozoítos, existem outras formas intermediárias que representam a progressão do zigoto durante a meiose (Cushion et al. 2007).

Uma das características de *Pneumocystis jirovecii* é a falta de certas capacidades metabólicas sendo esta uma característica típica de organismos parasitas obrigatórios. É crucial saber se as espécies de *Pneumocystis* são parasitas obrigatórios dependendo estritamente de seus hospedeiros ou se possuem formas livres sendo capazes de replicação fora do hospedeiro. O parasitismo tem sido sugerido com base em sua especificidade para determinados hospedeiros e sua flexibilidade genética (Cissé et al. 2012; Hauser et al. 2010).

1.6.Heterogeneidade

Quando da descoberta do *Pneumocystis* pensava-se que este micro-organismo era o mesmo na infecção de todos os mamíferos, já que eram morfológicamente muito semelhantes. Mais tarde foi sugerido que talvez se tratasse de várias espécies de um mesmo gênero e hoje esta teoria pode ser comprovada através das técnicas de biologia molecular. Além das características genotípicas específicas, estudos ultra estruturais (microscopia eletrônica) também demonstraram diferenças morfológicas (Wakefield 1998b).

Os organismos designados *Pneumocystis* compreendem um vasto grupo heterogêneo. Cada um deles possui tropismo para um determinado hospedeiro e só pode causar infecção nesse hospedeiro (específico de hospedeiro). A heterogeneidade entre os diferentes *Pneumocystis* tem sido demonstrada pelas características genotípicas através da análise do cariótipo e de sequências de DNA, entre *Pneumocystis* de diferentes espécies e entre os da mesma espécie. *Pneumocystis* obtidos de diferentes hospedeiros são geneticamente e antigenicamente distintos uns dos outros. Um problema em relação ao estudo do *P. jirovecii* é a falta de quantidade suficiente de micro-organismos necessários para análise em uma amostra (Wakefield 1998a; Ma et al. 2013).

Quando foi estudado o genoma de *P. carinii* e comparado ao de *P. jirovecii*, foram notadas algumas diferenças. Apesar de serem similares em algumas características fenotípicas como a expressão de glicoproteínas de superfície variável, o genoma de cada espécie verificou-se ter características únicas. A nível da sequência de DNA parece haver três níveis de diferenciação entre os organismos *Pneumocystis*. A primeira compreende diferenças entre organismos que infectam o mesmo tipo de hospedeiro. Por exemplo diferentes estirpes de *P. jirovecii* que infectam o homem. A segunda pode ser classificada como a observada em isolados de roedores (duas formas encontradas em ratos (*P. carinii* e *P. norvegicus*)) e por último, as diferenças normalmente encontradas entre isolados de diferentes espécies (Cushion et al. 2007; Wakefield 1998a)

Dentre as espécies de *Pneumocystis* é alto o grau de divergência genética entre elas. Por exemplo: entre *P. carinii* e *P. jirovecii* existe 4% de divergência em 441 bases do 16S-like rRNA. Uma das primeiras diferenciações a nível de sequência de DNA se encontra na subunidade maior mitocondrial do RNA ribossomal, com uma diferença de cerca de 14%

entre *P. carinii* e *P. murina* e 27% entre *P. carinii* e *P. oryctolagi*. Há também divergências na subunidade menor mitocondrial do RNA ribossomal, diferenciando-se entre 8% entre *P. carinii* e *P. murina* e 18% entre *P. carinii* e *P. jirovecii* (Stringer 1996; Wakefield 1998b)

Sendo assim, um hospedeiro infectado com determinada espécie pode ter várias estirpes diferentes dessa mesma espécie em uma mesma infecção. Ou seja, na infecção do homem, por exemplo, vários estudos mostraram uma diversidade genética sobre os isolados obtidos dos doentes sugerindo que diferentes estirpes de *P. jirovecii* podem infectar o homem. Doentes com PPC podem conter diferentes genes mt LSU rRNA e Espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês *internal transcribed spacer*) em uma mesma amostra, confirmando que estes doentes estão co-infectados com estirpes geneticamente distintas de *P. jirovecii* (Tamburrini et al. 1998; Latouche et al. 1998).

1.7.Pneumonia por *Pneumocystis* (PPc)

1.7.1. A infecção

Os primeiros casos de PPc foram encontrados em doentes homossexuais do sexo masculino e em casos de usuários de drogas injetáveis na década de 1980. Ainda hoje nos EUA e Europa, os casos de PPc continuam presentes primariamente em pessoas que desconhecem estarem infectadas por HIV, que não procuram ajuda médica ou que não seguem ou não respondem à terapia antirretrovírica ou à profilaxia anti-PPc. Em contraste à imunossupressão por HIV, outro fator de risco para PPc é o transplante de órgãos e o câncer. O uso crônico de corticosteróides também aumenta o risco de PPc. Por outro lado, nas regiões em desenvolvimento, tal como na África Subsaariana, o índice de casos com PPc até poucos anos era considerado baixo visto que são regiões com alto índice de indivíduos HIV positivo. No entanto, após estudos nestas regiões foram detectadas infecções por *Pneumocystis* com taxas de mortalidade em torno dos 50%. A primeira informação pode ter estado incorreta talvez devido à falta de recursos para o diagnóstico apropriado (Morris & Norris 2012; Matos 2012).

A PPc, quando não tratada, pode chegar a uma taxa de mortalidade de 100%, enquanto que quando tratada essa taxa baixa substancialmente mas ainda atinge os 10-20% (Gigliotti & Wright 2012).

A infecção, pode ocorrer devido a uma imunossupressão dando-se a reativação de uma infecção latente, adquirida durante a infância, ou através de uma infecção *de novo* por exposição ao ambiente ou indivíduos infectados. A questão sobre a reativação de uma infecção latente *versus* nova infecção é recorrente. Em uma análise da sequência do DNA do mt26 e da combinação ITS1-ITS2 (do inglês *internal transcribed spacers of the nuclear rRNA genes operon*), 50% dos casos mostraram diferenças alélicas no segundo episódio da doença comparado com o primeiro. Isso sugere que novas infecções estão frequentemente presentes na recorrência da PPc (Hauser et al. 1998; Morris & Norris 2012).

Um fator importante para sabermos o mecanismo de infecção do micro-organismo está relacionado com os cuidados a ter com os doentes. Se a origem da infecção é a reativação de uma infecção latente então o risco de transmissão para outros doentes no hospital é mínimo. Mas, se a origem é uma nova infecção transmitida a partir do ambiente ou através de

indivíduos infectados, sugere-se isolar o doente. No entanto, neste caso também os indivíduos colonizados por *Pneumocystis* podem ser considerados como reservatórios e como tal transmissores da infecção (Morris & Norris 2012).

A transmissão por via aérea é sugerida em estudos com roedores em laboratório e supõe-se que com os humanos essa transmissão se dê da mesma maneira. A transmissão pessoa-a-pessoa é mesmo bastante provável acontecer. Estudos em modelos animais mostraram que ratos imunossuprimidos quando colocados em contato com outros ratos com PPc ou colonizados, desenvolvem a doença. Um fator relevante para este tipo de transmissão é o que mostram alguns estudos que encontraram mutações para resistência no gene da DHPS (dihydropteroate synthase) importados de doentes com histórico de uso de sulfa. Agentes de saúde que trabalham diretamente com esses doentes também são prováveis transportadores destes micro-organismos (Latouche et al. 1998; Morris & Norris 2012)

Um exemplo de estudo que caracteriza bem a transmissão por via aérea é o realizado por Rivero *et al.*, 2008. Uma menina de seis meses de idade apresentava dificuldade para respirar e radiografia torácica com infiltrados intersticiais difusos, sugestivos de PPc. Foi detectado DNA de *Pneumocystis* pela amplificação do gene da subunidade mitocondrial maior do rRNA através de Nested-PCR de amostra de aspirado nasofaríngeo. Para investigar a origem da infecção fez-se uma busca nas pessoas que conviviam com a criança (irmão, pais e avós). Foi detectado DNA de *Pneumocystis*, em amostras de orofaringe dos avós, com o mesmo genótipo do micro-organismo da criança. Este estudo mostra a real possibilidade de transmissão de *Pneumocystis* de um indivíduo imunocompetente (colonizado) para um imunodeprimido, neste caso, dos avós para a criança (Rivero et al. 2008).

A colonização é definida como a detecção de organismos ou de seu DNA sem sinais ou sintomas de pneumonia. Apesar de que uma PCR (do inglês *Polymerase chain reaction*) positiva não possa distinguir colonização de infecção, alguns estudos têm demonstrado que o número de cópias de um gene específico de *P. jirovecii* medido por real-time PCR é significativamente maior em doentes com PPc do que nos colonizados. Vários termos – colonização, infecção assintomática e infecção subclínica – tem sido utilizados para descrever os achados laboratoriais e clínicos do *Pneumocystis*. O rastreamento dessa população colonizada pode ser importante para a definição da implementação ou não de profilaxia

nessas pessoas. Deve ser tido em consideração o grau de importância desses indivíduos na comunidade (Matos et al. 2006; Rivero et al. 2008; Matsumura et al. 2012)

Pneumocystis possui várias características que contribuem para a afirmação de que este micro-organismo pode permanecer no hospedeiro sem causar infecção durante longos períodos. Um exemplo é o fato de variar suas glicoproteínas de superfície a fim de sobreviver à resposta imunitária do hospedeiro. Alguns estudos têm demonstrado que em uma população normal de indivíduos saudáveis, a maioria possui anticorpos para *Pneumocystis* indicando exposição contínua ao micro-organismo (Wakefield 1998a; Morris & Norris 2012).

A hipótese da nova infecção pode ser defendida por exemplo pelo fato de existirem diferentes genótipos de *Pneumocystis* a cada repetição da infecção. Também, diferentes genótipos de *Pneumocystis* podem ser encontrados em diferentes cidades e países. Sendo assim, o genótipo de um determinado organismo em uma nova infecção está associado ao local de morada do indivíduo e não com o seu local de nascimento (Morris & Norris 2012)

Geralmente a PPc se apresenta com febre, tosse não produtiva e falta de ar progressiva. Dentre os sintomas da PPc é incomum a presença de escarro purulento ou dor torácica. O raio-x geralmente apresenta infiltrados reticulares bilaterais ou granulares. Porém, no início da infecção o raio-x pode se apresentar normal, sem alterações. Dificilmente a infecção causa adenopatia intratorácica ou derrame pleural (Huang 2011; Morris & Norris 2012)

No caso de PPc severa ocorre intensa inflamação pulmonar caracterizada pelo excesso de neutrófilos e linfócitos T CD8+ resultando em dano alveolar difuso, comprometimento da troca gasosa e insuficiência respiratória. A disseminação extra pulmonar da infecção é rara. Os sítios mais atingidos são linfonodos, baço, fígado e medula óssea (Latouche et al. 1998; Cho et al. 2009; Evans et al. 2012)

1.7.2. Resposta imunitária

A resposta imunitária é um dos determinantes patogênicos durante a infecção envolvendo a interação entre as células do sistema imunitário e mediadores solúveis como as citocinas e quimiocinas. A contagem de células T CD4+ e sua função também determinam a susceptibilidade do hospedeiro. Além disso, essas células também contribuem para a lesão pulmonar mediada pela imunidade (Wang et al. 2011)

A resposta imunitária do hospedeiro contra o micro-organismo envolve as respostas humoral e celular, assim como macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos e citocinas que irão promover o curso da infecção (Morris & Norris, 2012).

O primeiro estágio da infecção envolve a ligação do micro-organismo ao epitélio pulmonar, de preferência aos pneumócitos do tipo I, produzindo um aumento da permeabilidade no alvéolo pulmonar. Esse aumento leva a um influxo de proteínas do plasma, no espaço alveolar, alterando a composição do fluido de revestimento do epitélio alveolar (Prévost et al., 1998).

Os pneumócitos de tipo II também estão envolvidos na patogênese de *Pneumocystis*. Mantêm a integridade estrutural do alvéolo, necessária para conduzir as trocas gasosas (Su & Martin 1994).

O surfactante pulmonar, que cobre a superfície alveolar, tem um importante papel na homeostase alveolar e na defesa pulmonar, sendo sintetizado pelos pneumócitos tipo II e contém lipídios e proteínas (Prévost et al. 1998)

Os trofozoítos do *Pneumocystis* utilizam a fibronectina como ligando para se fixarem às células do hospedeiro. A MSG (do inglês *major surface glycoprotein*) é o ponto de ligação da fibronectina, sendo fortemente antigênica. Outras proteínas de adesão que podem estar envolvidas são a laminina e a vitronectina (Su & Martin 1994). A vitronectina potencializa significativamente o reconhecimento do micro-organismo pelos macrófagos se ligando ao β -glucano, e ajuda na indução de liberação de TNF- α . Por sua vez o TNF- α se liga ao β -glucano através da lectina (Olson et al. 1996)

Glicoproteínas de superfície contendo ligantes de carboidratos são encontradas na barreira eletro-densa de *Pneumocystis*. O ligamento dessas glicoproteínas às diferentes lectinas também tem papel na ligação à célula do hospedeiro (Su & Martin 1994).

Pneumocystis estimulam a proliferação de células T e os linfócitos T CD4+ são os principais agentes na resposta imunitária contra a infecção. Na infecção por HIV, como a contagem de células T CD4+ é baixa, as células T não proliferam devidamente apesar de a função citotóxica estar preservada. Em estudos com ratos, por exemplo, a deficiência em células T CD4+ não impede a resposta inflamatória que inclui infiltração perivascular de células mononucleares, alveolite por células T CD8+ e ativação dos macrófagos alveolares (Su & Martin 1994).

Pneumocystis induz a produção e libertação de uma variedade de mediadores da resposta inflamatória pelos fagócitos. O TNF- α , por exemplo, é produzido e libertado pelos macrófagos alveolares. Além disso os quistos de *Pneumocystis* induzem a produção de TNF- α em culturas de monócitos e macrófagos. A libertação de TNF- α tem sido vista como uma resposta normal tanto em ratos imunocompetentes quanto naqueles com baixa contagem de células T CD4+ (Su & Martin 1994).

Alguns estudos indicam que os macrófagos liberam TNF- α após interação da membrana de receptores do β -glucano com os micro-organismos (Olson et al., 1996).

Outras citocinas e mediadores da resposta inflamatória associados a *Pneumocystis* incluem interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), IFN- γ , GM-CSF (do inglês *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), G-CSF (do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*) e eicosanoids (Su & Martin 1994). Estudos têm demonstrado que o TNF- α e a IL-1 têm grande importância na resistência do hospedeiro à infecção (Walzer 1999).

Em infecções experimentais com ratos imunocompetentes, tanto as células T CD4+ quanto as T CD8+ acumulam-se nos pulmões para controlar a infecção. Porém, em estudos com ratos deficientes de células T CD4+, as T CD8+ invadem os pulmões mas não conseguem controlar a infecção (Morris & Norris, 2012).

Além da grande perda de células T CD4+ durante a infecção por HIV, há também a perda de células B. Uma característica principal das células B durante a infecção por *Pneumocystis* é a liberação de anticorpos. As Imunoglobulinas M (IgM) produzidas pelas células B têm um papel importante como defesa inicial contra o micro-organismo ao reconhecer antígenos de hidratos de carbono comuns aos fungos. Há também o reconhecimento de antígenos fúngicos apresentados pelas células dendríticas (células apresentadoras de antígenos) (Morris & Norris, 2012).

Os macrófagos alveolares têm um importante papel na *clearance* de micro-organismos do pulmão, são as principais células fagocíticas do trato respiratório inferior e, quando estimuladas pelas citocinas na resposta inflamatória (ex.:IFN- α), são as primeiras células a se ligar e eliminar patógenos do trato respiratório, como *Pneumocystis* (Morris & Norris 2012; Nakamura 1998).

Uma resposta inicial típica dos macrófagos alveolares inclui quimiotaxia, migração, ligamento e fagocitose. A eletro-microscopia revela que os macrófagos vão ao encontro do *Pneumocystis*, estendem seus pseudópodes e ingerem tanto trofozoítos como quistos (Su & Martin 1994).

Após a internalização e formação do fagolisossomo, o micro-organismo é degradado pela liberação de espécies reativas de oxigênio (radicais superóxido e peróxido de hidrogênio) a partir de diferentes tipos de células como neutrófilos e monócitos. A geração de metabolitos tóxicos, como o óxido nítrico, é necessária para eliminar o micro-organismo, e a resistência de *Pneumocystis* a estes compostos tóxicos tem sido estudada (Su & Martin 1994; Morris & Norris 2012).

O conceito de que *Pneumocystis* se mantém latente nos pulmões após uma infecção primária pode ser suportado pela presença de anticorpos em indivíduo já saudável e pela ocorrência de PPC em novos casos de imunossupressão. A recorrência da PPC pode também acontecer pelo fato de o hospedeiro não ser capaz de eliminar eficientemente os micro-organismos (Latouche et al. 1998).

1.8. Identificação laboratorial

Como *Pneumocystis* não pode ser cultivado *in vitro*, sua detecção laboratorial é baseada principalmente na observação microscópica além de técnicas moleculares. Algumas das principais técnicas utilizadas para coloração de amostras processadas, provenientes do pulmão, para observação de formas morfológicas do micro-organismo em microscopia ótica são a metanamina prata, Giemsa e toluidina azul. Além da microscopia ótica outras opções diagnósticas também estão disponíveis como a imunofluorescência direta ou indireta (IF) com anticorpos monoclonais específicos para *P. jirovecii* (Gill et al. 1987; Olsson et al. 1993).

O pouco conhecimento sobre a biologia de *P. jirovecii* é devido principalmente ao fato de que nenhum método de cultura *in vitro* está disponível atualmente. Estes micro-organismos só podem ser obtidos a partir de espécimes clínicos de doentes, mesmo assim, em quantidades muito limitadas e fortemente contaminadas por células humanas e flora pulmonar. Para um organismo de importância clínica, a sequência do genoma representa uma riqueza em novas informações. Permite novas análises que resolvem questões críticas, tais como o desenvolvimento de culturas *in vitro* ou de novos alvos terapêuticos. De acordo com o estudo de Cissé *et al*, 2013, *P. jirovecii* possui grande falta de substâncias, como o ergosterol, que o micro-organismo retira do hospedeiro humano. Só conhecendo esses dados podemos afirmar que a revelação do sequenciamento genético deste micro-organismo contribui para que saibamos a constituição de um meio de cultura *in vitro* para *Pneumocystis* (Cissé et al. 2012; Cushion & Keely 2013).

O genoma quase completo do *P. carinii* (<http://pgp.cchmc.org>), que é a espécie relativamente mais próxima de *P. jirovecii*, fornece uma grande oportunidade para investigar melhor a espécie *jirovecii*. Outros fungos de vida livre intimamente relacionados que possibilitam uma ótima oportunidade de comparação e investigação são *Saccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* (Hauser et al. 2010).

Em animais de laboratório, *Pneumocystis* podem ser isolados após imunossupressão. Em humanos, devido à baixa quantidade de micro-organismos na amostra biológica, utiliza-se, além da microscopia, a técnica de PCR pela sua maior especificidade para identificar o micro-organismo. *Pneumocystis* são micro-organismos muito pequenos e com facilidade

para formar agregados, o que dificulta o processo de purificação e separação das células do hospedeiro. Uma PCR positiva para *Pneumocystis*, por exemplo, pode providenciar um diagnóstico mais precoce do que a microscopia, que pode não detectar os micro-organismos pela falta de quantidade suficiente nas amostras (Hauser et al. 1998; Tamburrini et al. 1998; Aliouat-Denis et al. 2009).

As técnicas moleculares têm um importante papel se aplicadas às amostras não invasivas como escarro induzido ou lavados da orofaringe. É bastante útil, por exemplo, em infecções assintomáticas em HIV positivos para que a profilaxia possa ser rapidamente iniciada (Tamburrini et al. 1998).

Algumas das técnicas de detecção molecular de *Pneumocystis* são a *nested-PCR*, *Real-Time PCR* e *Multiplex-PCR*, além da PCR simples. Apesar de bastante sensíveis estas técnicas são geralmente mais utilizadas na investigação do que no diagnóstico diário da PPc (Olson et al. 1996; Tamburrini et al. 1998; Esteves et al. 2011a).

O diagnóstico clínico é bastante complexo já que nenhum sintoma, achado radiológico ou resultados de gasometria são específicos para a PPc. Algumas alterações bioquímicas e hematológicas também podem estar presentes fornecendo mais um aliado na identificação da PPc, apesar de que não são específicas. Alguns dos marcadores são a LDH (do inglês *serum lactate dehydrogenase*), geralmente elevada, e PaO₂, normalmente baixa nos casos de PPc. LDH é uma enzima citoplasmática presente nos principais órgãos. O seu aparecimento extracelular indica dano celular ou morte celular, sendo então um marcador inespecífico. Os níveis de LDH parecem variar em paralelo com a actividade da doença. Um nível normal de LDH não exclui um possível diagnóstico de PPc (Vogel et al. 2011; Morris & Norris 2012; Esteves et al. 2014).

Em doentes HIV positivos com pneumonia atípica, a elevação da LDH correlaciona-se com o grau de dano tecidual no pulmão e sua sensibilidade em presença de PPc é concreta. Já nos imunocomprometidos HIV negativos a correlação do LDH com a PPc ainda não está bem esclarecida e não é considerada 100% confiável. Em estudo feito por Vogel *et al* comparando os níveis de LDH em doentes HIV positivos e negativos com PPc, a enzima mostrou-se elevada em 100% dos casos de HIV positivos com PPc e em apenas 63% dos

HIV negativos com PPc. Porém, a LDH mostrou-se elevada na maioria dos doentes com PPc e permaneceu em níveis normais na maioria dos doentes sem PPc (Vogel et al. 2011).

1.9. Tratamento e profilaxia

A detecção precoce e uma terapia são vitais para a redução da mortalidade relacionada com a PPc. A introdução da terapia antirretrovírica no tratamento da infecção do HIV tem sido acompanhada por uma redução significativa na mortalidade e incidência de infecções oportunistas, incluindo a PPc (Stringer et al. 2002; Held et al. 2011).

O risco de PPc em doentes com HIV positivo está inversamente relacionado com o número de células T CD4+ circulantes, reforçando a recomendação de profilaxia anti-*Pneumocystis* quando a contagem de células T CD4 for $\leq 200/\text{mm}^3$, e sua descontinuação quando a contagem de células T CD4 > 200 cél/mL, mantida por três meses ou mais durante a terapia antirretrovírica (Wang et al. 2011; Walzer 1999; Costiniuk et al. 2011).

A PCP é refratária às terapias antifúngicas *standard* como os agentes fármacos fungiestáticos e a anfotericina B. A terapia primária para a PCP é a combinação de trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) em associação com corticosteróides. No entanto, podem existir falhas significativas associadas à essa combinação. Terapias de segunda linha como clindamicina/primaquina, dapsona-trimetoprim, atovaquona ou pentamidina também têm altas taxas de recorrência. Para os doentes tratados com Pentamidina inalada em aerossol há sempre o inconveniente de o tratamento ter que ser feito mensalmente no hospital (Stringer 1996; Cushion & Stringer 2010; Costiniuk et al. 2011)

A associação com corticosteroides é recomendada para doentes com PPc moderada a severa com tensão do oxigênio arterial (PaO_2) menor que 70 mmHg ou oxigênio alveolar-arterial (A-aO_2) maior que 35mmHg (Huang, 2011).

A atividade anti-*Pneumocystis* do TMP-SMX, por exemplo, é essencialmente devida ao componente sulfametoxazol. Dapsona, outra sulfa, é outro exemplo de fármaco utilizado na prática clínica para inibir a enzima dihidropteroato sintetase (DHPS) associada à possível emergência de resistência (Wakefield, 1998b).

Pneumocystis não respondem às terapias que tem por alvo a síntese dos ergosteróis. Este micro-organismo utiliza o colesterol como fonte de esterol primário. Os ergosteróis, sendo definidos como a massa de esteróis predominante na maioria dos fungos e alvo de

várias terapias anti-fúngicas, não podem ser encontrados nas espécies de *Pneumocystis* (Cushion et al. 2007).

No estudo de Cissé *et al*, 2012 notou-se falta do ciclo do glioxilato em *P. jirovecii* (também em falta em *P. carinii*) restringindo mais ainda os alvos terapêuticos já que esta via é um caminho para o ciclo do ácido cítrico, não encontrado em humanos. Este é um importante fator de virulência já que os fungos que conseguem sobreviver à fagocitose parecem induzir esse ciclo, enquanto aqueles que não o conseguem fazer parecem ser incapazes de se reproduzir e causar doença (Cushion & Keely 2013).

Há evidências que indicam que as populações de *P. jirovecii* estão envolvidas na resistência às terapias convencionais com sulfametoxazol, trimetoprim e atovaquona através de mutações específicas (Cushion & Stringer 2010).

Estudos recentes têm demonstrado a eficácia de equinocandinas contra as formas quísticas do *Pneumocystis* (Cushion & Stringer 2010). Tem havido grande interesse neste agente tanto para profilaxia quanto para tratamento com ação direta na síntese do β -glucano. Estudos em modelos animais demonstraram que este agente é eficaz contra a forma quística do micro-organismo, mas não contra a forma trófica (Morris & Norris 2012; Lobo et al. 2013).

2. Célula fúngica

A parede celular de uma célula fúngica tem sido descrita como um complexo contendo glucano, manano, quitinas, fosfato, lipídio e proteína. O (1,3)- β -glucano forma uma rede fibrosa visível em microscopia eletrônica da superfície na parede celular. O complexo (1,3)- β -D-Glucano / Quitina é o principal constituinte da parede interna. O (1,6)- β -Glucano liga os componentes entre a parede interna e externa. Na superfície externa da parede estão as manoproteínas, que são extensivamente glicosiladas em O e N. Estas ligações são covalentemente densas e limitam a permeabilidade da parede (Manners et al. 1973; Lipke & Ovalle 1998).

2.1. β -Glucano

O (1,3) β -D-Glucano (β -Glucano) (BG) (Figura 5) é um polissacarídeo da parede celular de vários fungos. A medição regular dos níveis de BG no soro é reconhecida como um marcador de diagnóstico muito útil no caso de infecções fúngicas (Sendid et al. 2013; Esteves et al. 2014).

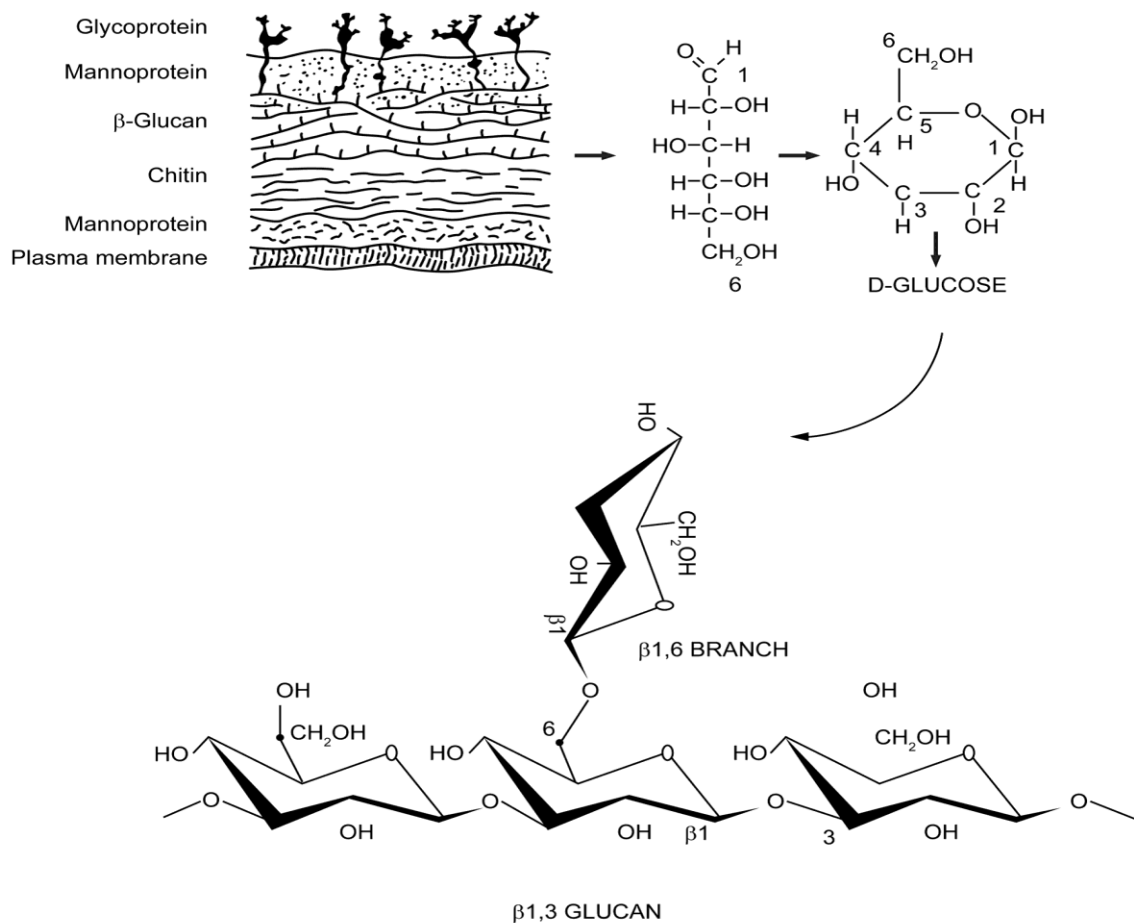


Figura 5: Base de um β -glucano fúngico. A subunidade básica do β -glucano fúngico é composta por β -D-glicose ligadas umas às outras por cadeias glicosídicas 1->3 com braços glicosídicos 1->6 (Chan et al. 2009)

O BG é o componente mais abundante da parede celular de fungos uniformemente distribuído ao longo da célula, tendo uma potente ação imunomoduladora com efeito tanto na resposta imune inata como na adaptativa. A resposta imunitária é desencadeada após

interação com receptores do hospedeiro como a dectina-1 e complemento 3, e podem ser detectados no LBA e no soro em doentes com PPc (Cid et al. 1995; Chan et al. 2009; Morris & Norris 2012; Esteves et al. 2014)

Dectina-1 é o receptor de superfície celular para os β -Glucanos durante a resposta imunitária, expresso principalmente nos monócitos/macrófagos e neutrófilos (Figura 6). A cauda citoplasmática do dectin-1 contém um imunoreceptor de ativação baseado em tirosina (ITAM) que sinaliza através da tirosina cinase, em colaboração com receptores Toll-like 2 e 6 (TLR-2/6) (Brown et al. 2007; Chan et al. 2009).

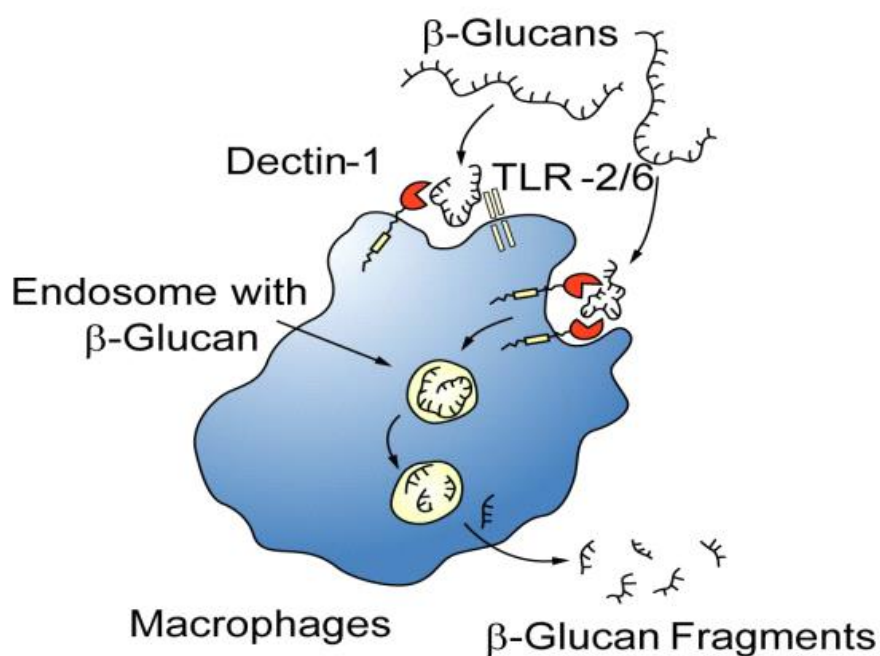


Figura 6: Os β -Glucanos são capturados pelos macrófagos através do receptor dectin-1 com ou sem a ajuda do TLR-2/6. As moléculas de β -Glucano são internalizadas e fragmentadas em moléculas menores e então liberadas. Estes pequenos fragmentos serão eventualmente capturados pelos granulócitos, monócitos ou macrófagos circulantes via receptor complemento CR3 [Adaptado de (Chan et al. 2009)].

A habilidade do Complemento 3 de reconhecer o β -Glucano sugere que este seja o maior receptor de β -Glucanos nos leucócitos e que medeia os efeitos imunomoduladores (Brown et al. 2002).

(1->3)- β -D-glucano é um biomarcador sérico para a PPc. Durante o curso de uma infecção invasiva o BG é liberado no soro com meia vida de cerca de 20 horas. Porém, sua

via de eliminação ainda é desconhecida sendo que em estudos em coelhos foram encontrados BG em alguns órgãos (fígado e rim) e em urina e sangue (Held et al. 2011).

A PPc é uma grande causa de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos e, portanto, um diagnóstico precoce é fundamental (Held et al. 2011).

A análise dos níveis de BG pode ser utilizada para confirmar o sucesso no tratamento, mas parece ser limitada na identificação de um caso de insucesso terapêutico. Em um estudo com 18 doentes durante terapia anti-PPc, Held & Wagner, 2011 mostraram que a baixa valores de BG sérico estão fortemente correlacionados com melhoria no curso clínico da doença. Já o aumento desses valores foi associado ao insucesso terapêutico ou com resultado fatal em apenas 44% dos doentes. Estes autores concluíram que os níveis séricos de BG podem ser utilizados para confirmar sucesso no tratamento, mas parecem estar limitados quando relacionados com insucesso terapêutico (Held & Wagner 2011)

2.2. A importância do β -(1,3)-glucano como marcador na clínica

Estabelecer o diagnóstico da PPc requer a identificação do patógeno fúngico utilizando alguns métodos de diagnóstico em amostras respiratórias como escarro induzido ou LBA. No entanto, muitos doentes não têm condições de fornecer uma amostra biológica adequada. Além disso, o diagnóstico pode ser difícil em doentes que recebem profilaxia para PPc, levando a um curso clínico alterado e baixa contagem de micro-organismos (Karageorgopoulos et al. 2011)

Além dos testes feitos através de amostras pulmonares, há também testes complementares, minimamente invasivos feitos em amostras de sangue, por exemplo, que incluem, para além de outros marcadores, o teste com o β -glucano. Este teste tem sido desenvolvido e é aplicável a alguns doentes como alternativa à microscopia, especialmente àqueles muito debilitados para serem sujeitos a procedimentos invasivos. Porém, este não é um teste específico para *P. jirovecii*, podendo causar resultados falso-positivos (Yasuoka et al. 1996; Costa et al. 2012; Matsumura et al. 2012; Esteves et al. 2014)

Medir o nível plasmático de (1->3)- β -D-Glucano (BG), um componente da parede celular da maioria dos fungos, incluindo *P. jirovecii*, pode ser de grande ajuda para estabelecer o diagnóstico de PPc. Existem hoje vários *kits* disponíveis comercialmente (Desmet et al. 2009).

Os níveis séricos elevados de BG não estão elevados apenas na PPc mas também em outras doenças infecciosas fúngicas e, portanto, os níveis de BG sozinhos não podem provar a existência de PPc e também não deve ser interpretada sem ter em consideração os dados clínicos (Held et al. 2011).

São várias as fontes de reações falso-positivas no teste do BG. Tem sido encontrado BG aumentado em casos de antibióticos derivados de fungos, bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa*, e interferência na detecção de BG nos casos de altos níveis de hemoglobina, bilirrubina, proteínas e triglicérides no soro (Sendid et al. 2013).

Em um estudo que analisou a quantidade de β -glucano em doentes com e sem PPc, os níveis de BG também se mostraram positivos em doentes com candidíase oral ou

esofaríngia. Outras infecções fúngicas que podem acusar positividade para o β -glucano é a aspergilose, fusariose, trichosporidiose e histoplasmoze (Sax et al. 2011).

Mesmo assim, até hoje, nenhum parâmetro confiável está disponível para o diagnóstico sorológico da PPc (Held et al. 2011).

Porém, um estudo feito em doentes internados com AIDS avaliou os níveis séricos de β -D-Glucano dos doentes com e sem PPc e com e sem outras infecções fúngicas (*Candida* e *Cryptococcus*). Os níveis séricos de β -D-Glucano foram significativamente mais elevados nos doentes com PPc do que nos sem PPc, sendo que as outras infecções não influenciaram nos resultados. Em algumas infecções fúngicas normalmente os níveis de β -D-Glucano aumentam, mas não tão significativamente quanto na PPc. Neste estudo, os níveis de β -D-Glucano normalizaram apenas meses ou anos após o tratamento, mas estavam bastante aumentados logo no início do tratamento. O breve aumento se dá provavelmente pela lise de *Pneumocystis* após o início do tratamento. Apesar disso, os autores afirmam que os níveis de β -D-Glucano não refletem a eficácia do tratamento (Watanabe et al. 2009).

Em um estudo de caso de doente imunocomprometida HIV-negativo uma PCR do LBA foi positiva para *Pneumocystis* indicando pneumonia por este patógeno causada pela imunossupressão após radioterapias e tratamento com corticosteróides. Os níveis séricos de β -D-Glucano se mostraram marcadamente aumentados antes do tratamento e diminuíram significativamente após a administração de TMP-SMX. Apesar da detecção do microorganismo na PCR, neste caso o autor afirma poder suspeitar de PPc pelos níveis de β -D-Glucano estarem tão aumentados, incompatíveis com os níveis nas infecções por outros fungos (*Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus*). Conclui-se então que a determinação dos níveis de β -D-Glucano neste caso, de doente imunodeprimido HIV-negativo, pode ser considerado a ponto de diagnóstico (Teramoto et al. 2000).

A forte associação do BG com doentes HIV-positivos com PPc pode ter sérias implicações clínicas especialmente quando amostras de espécimes pulmonares não estão disponíveis, já que geralmente a carga parasitária nos doentes HIV-positivos é altamente elevada e por isso os níveis séricos de BG são extremamente elevados, incomparáveis com outras infecções fúngicas (Sax et al. 2011).

Um outro estudo feito por Desmet *et al*, mostrou que a detecção do BG no soro de doentes HIV-positivos e doentes com neoplasia hematológica foi excelente no diagnóstico da PPc com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,4% (Desmet et al. 2009).

Em um outro estudo foram investigados os níveis séricos de BG em crianças (média das idades: seis meses) desenvolvendo infecção primária por *Pneumocystis*. Os níveis de BG nessas crianças foram menores do que nos doentes adultos com PPc, porém positivos em 93% delas (Damiani et al. 2011).

A detecção do β -Glucano tem sido reconhecida como um marcador sorológico simples e sensível para infecções fúngicas, mas ainda não pode ser utilizado na identificação e diferenciação de espécies. Porém, sua associação com LDH e outros parâmetros diagnósticos pode ser uma abordagem promissora como procedimento alternativo para o diagnóstico da PPc (Watanabe et al. 2009; Esteves et al. 2014).

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

O principal objetivo deste estudo é identificar e caracterizar a sequência genética do beta-glucano de *P. jirovecii* a partir de ampliações por técnicas de PCR com base nas sequências descritas do beta-glucano de *P. carinii* e na sequência completa de *P. jirovecii*.

A identificação genética do gene da Glucano Sintetase em *Pneumocystis jirovecii* tem grande importância para a prática clínica. Quantificar níveis de β -glucano séricos tem ajudado na identificação diagnóstica de patologias fúngicas. Porém, o teste não é específico para *Pneumocystis*.

A amplificação da sequência de nucleotídeos que corresponde ao fragmento da Glucano Sintetase de *Pneumocystis* por PCR foi específica tendo como base a sequência de *P. jirovecii* disponível. O β -glucano de cada espécie fúngica é identificado como único, aumentando as possibilidades de investigação e atuação clínica.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Identificar a sequência genômica de *P. carinii* e *P. jirovecii*.
- 2) Comparar a sequência genômica do β -glucano de *P. carinii* com a sequência disponível de *P. jirovecii* em métodos bioinformáticos e identificar a sua possível posição.
- 3) Desenhar primers específicos para a região a ser amplificada.
- 4) Estabelecer protocolos de PCR e LongRange PCR para amplificação do fragmento.
- 5) Realizar amplificação e sequenciamento do fragmento.

4. Material e métodos

4.1.Dados das amostras e população em estudo

Para a realização do estudo foram obtidas várias amostras biológicas de secreções pulmonares (LBA) provenientes de doentes HIV-positivos com PPC, da região de Lisboa. Estas amostras foram previamente diagnosticadas como positivas para *P. jirovecii*. Este diagnóstico foi feito através de imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais (IFI/AcM) e por técnicas de PCRs. Para integrar o estudo foram escolhidas aquelas amostras que apresentavam maior quantidade de micro-organismos presentes.

Após a escolha das amostras positivas o DNA de *P. jirovecii* foi extraído com auxílio do método do Mini-BeadBeater (Roche) de acordo com o que já foi descrito em estudos anteriores (Esteves et al. 2008)

4.2.Processo bioinformático e desenho de primers

O primeiro passo na atuação prática foi a realização do processo bioinformático. A sequência disponível atualmente do gene que codifica para a β -glucano sintetase de *P. carinii* foi tida como base para análise (Disponível no *GenBank* pelo número de acesso AF191096.1) (Kottom & Limper 2000). Foi utilizado o programa BLAST para comparar a sequência com possíveis outras sequências semelhantes, de outros micro-organismos (Figura 7).


Alignments  Download v GenBank Graphics Distance tree of results					
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Pneumocystis carinii beta-1,3-glucan synthase GSC-1 mRNA, complete cds	10776	10776	100%	0.0	100%
Pneumocystis murina B123 hypothetical protein partial mRNA	8421	8421	100%	0.0	93%
Pneumocystis carinii 1,3-beta-glucan synthase GSC-1 gene, complete cds	4946	9638	99%	0.0	99%
Tetrapispora phaffii CBS 4417 hypothetical protein (TPHA0K01270) mRNA, complete	950	950	31%	0.0	76%
Tetrapispora phaffii CBS 4417 chromosome 11, complete genome	950	950	31%	0.0	76%
Debaryomyces hansenii CBS767 chromosome C complete sequence	773	773	31%	0.0	74%
Debaryomyces hansenii CBS767 DEHA2C01870p (DEHA2C01870g) mRNA, complete	773	773	31%	0.0	74%
Naumovozyma castellii CBS 4309 hypothetical protein (NCAS0A02040) mRNA, comple	737	737	34%	0.0	74%
Naumovozyma castellii CBS 4309 chromosome 1, complete genome	737	737	34%	0.0	74%
Saccharomyces castellii clone Contiq1888 GCS2 gene, partial cds	737	737	34%	0.0	74%
Naumovozyma dairenensis CBS 421 hypothetical protein (NDAI0D03980), mRNA	688	688	31%	0.0	74%
Naumovozyma dairenensis CBS 421 chromosome 4, complete genome	688	688	31%	0.0	74%
Tetrapispora phaffii CBS 4417 hypothetical protein (TPHA0F01030) mRNA, complete	638	638	31%	3e-178	73%
Tetrapispora phaffii CBS 4417 chromosome 6, complete genome	638	638	31%	3e-178	73%
Scheffersomyces stipitis CBS 6054 1,3-beta-D-glucan synthase subunit (BGS3) (GSC2	433	433	31%	1e-116	71%
Scheffersomyces stipitis CBS 6054 chromosome 3, complete sequence	433	433	31%	1e-116	71%

Figura 7: Resultado do alinhamento da sequência do β -Glucano de *P. carinii* com outras possíveis sequências de micro-organismos semelhantes. O resultado foram 16 sequências de 8 espécies diferentes que se assemelham na ordem dos 70-90%.

A partir destes resultados formou-se uma sequência de bases que foi analisada no programa MultAlin (*Multiple sequence alignment*) disponível *online* em <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/multalin.py>. Este procedimento permitiu obter o alinhamento das sequências e facilitar a análise das bases. Foram então desenhados *primers* (Forward e Reverse) para amplificação da mesma (Tabela 2). A análise dos *primers* delineados foram submetidas à qualificação pelo programa Oligo Analyzer, disponível *online* no site <https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Este nos mostra as características específicas de cada *primer* como sua temperatura de *melting*, percentagem de bases G e C e comprimento.

Tabela 2: Sequência de primers desenhados para amplificação da sequência completa.

Sequência do <i>Primer</i> 5' ->3'	Temperatura (°C)	Produto de PCR esperado (bp)
Fw1 GCA TTA TTA CGA TGA	38,3	2564
RV 1 GTT TGG AAT GCC	37,6	
Fw 2 GGA GTT TCT ATA TGG	37,8	3360
RV 2 GTT CGT CGA TAT GC	42,6	

O objetivo inicial era amplificar a sequência completa com estes dois pares de primers de modo que Fw1 emparelhava com Rv1 amplificando um fragmento de 2.564 bp (*base pair*), Fw2 e Rv2 amplificando um segundo fragmento de 3.360 bp, e por fim Fw1 e Rv2 amplificariam a sequência quase completa de 5.789 bp (Figura 8).

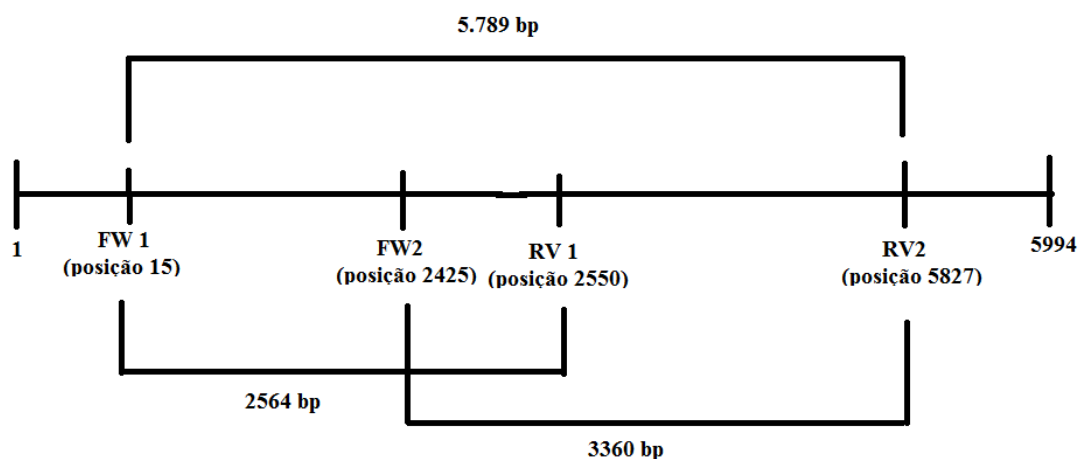


Figura 8: Mapa dos fragmentos a serem amplificados a partir da sequência de bases obtidas (5994 bp) de acordo com os primers desenhados. Do Fw1 ao Rv 1 foi feita uma amplificação onde se esperava um resultado de 2564 bp. Do Fw2 ao Rv2 foi feita uma segunda amplificação onde se esperavam 3360 bp amplificados. Notar que o Fw2 está posicionado antes do Rv1 para que pudesse abranger todas as bases de modo a não perder informação.

4.3.LongRange PCR

Para amplificação das sequências formadas após a análise dos *primers*, foi utilizada a técnica de LongRange PCR. O *kit* contém todos os componentes necessários para a amplificação de fragmentos de PCR longos (até 40 kb de tamanho). Uma combinação única

de polimerases de DNA termoestáveis, que permite uma melhor processabilidade e a amplificação de produtos de comprimento total por PCR - mesmo a partir de quantidades muito pequenas de molde. Esta foi a técnica de escolha inicial para amplificação dos fragmentos que cobrem toda a sequência, já que o kit (Qiagen LongRange PCR Kit) permite amplificar longos segmentos, até 40 kb, facilitando também a amplificação de fragmentos de amostras difíceis. As condições foram desenhadas a partir das instruções do fabricante. Foi feita uma reação de 50 µl contendo Enzyme Mix, LongRange PCR Buffer (10x), dNTP Mix (10 mM cada), Q Solution (5x), MgCl₂ (25mM), DNA e água.

Para além da LongRange PCR, foi feito também um processo de extração de banda em gel para obtenção de amostra única, pois, o resultado da PCR mostrou a banda pretendida, a amplificação de bandas inespecíficas, sendo necessário encisar as bandas para além das pretendidas no gel e proceder à sua purificação, através de um *Kit* de extração de gel específico (Qiagen). Este kit de purificação é útil na recuperação de 70 - 80% de DNA de 70 bp – 10 kb. O *kit* utiliza processos de dissolução do gel, lavagens e eluições para a retirada de impurezas.

4.4. Sequência genética para *Pneumocystis jirovecii*

Após o início do nosso estudo, foi publicada a sequência genética completa de *P. jirovecii*, que foi obtida através da identificação em uma amostra do trato respiratório de um doente (Cissé et al. 2012). Sendo assim, nova orientação foi definida para a continuidade dos objetivos deste estudo.

4.4.1. Processo bioinformático e desenho de primers

Fez-se nova análise bioinformática dos dados disponíveis. Analisou-se primeiramente no BLAST a sequência do gene do β-glucano sintetase disponível de *P. carinii* em paralelo com a nova sequência descrita de *P. jirovecii*. Concomitantemente, as mesmas sequências foram analisadas no MultAlin a fim de facilitar o estudo. O resultado foi uma sequência de bases de onde foram desenhados *primers* da mesma forma que anteriormente a fim de amplificar a nova sequência formada.

Foram desenhados neste caso 18 *primers* que cobrem toda a sequência resultante do emparelhamento e formam assim nove sequências para amplificação (Tabela 3). Para cada par de *primers* escolhidos foram feitas as otimizações necessárias na reação de PCR para que pudessem ser amplificados os fragmentos de, aproximadamente, 500 pares de base (pb). Neste caso optou-se por fazer amplificações de fragmentos menores visto que o processo é mais rápido e denota resultados mais precisos que a amplificação de longos fragmentos pela técnica de LongRange PCR. A técnica de PCR simples foi a escolhida para realizar a amplificação de fragmentos da sequência, por sua fácil execução, relativamente baixo custo e boa especificidade e sensibilidade.

Tabela 3: Sequência dos primers desenhados para fazer a amplificação da sequência em fragmentos de cerca de 500 pb cada.

Sequência	Sequencia do Primer	Temperatura (°C)	Produto de PCR (pb)
1	Forward: GCA TTA TTA CGA TGA	38,3	563
	Reverse: GAT CGT ATG CAC C	41,2	
2	Forward: GAA GGT TCA GAA GC	42,2	536
	Reverse: CAG CAT CAT CTA AAT C	40,6	
3	Forward: GGA ATT GGT ATT TTG C	42,1	578
	Reverse: CTT TTT CCA TAC TAC ATC	41,9	
4	Forward: GTC GTG AGC GTG ATC AT	52,1	569
	Reverse: CTC CTA AAG GCA TGA TTG C	51,1	
5	Forward: GTA TAT GTA ATA AAA TTC G	37,9	514
	Reverse: GGG AGT TTC TAT ATG G	41,9	
6	Forward: CTG ATC TGG TAT TAT TC	40,1	640
	Reverse: GCA ATT GTT TAA GAT ATT C	41,5	
8	Forward: GCA TAT TTG GAT GAA GAG C	48,8	601
	Reverse: CGT ATT AAG CAT TGT G	41,6	
9	Forward: CCTTTTATGACTACTAGAG	43,5	665
	Reverse: GGTGCTCGATATATTG	41,6	
12	Forward: CAA TAA TGA TTC TTA CTC	39,1	530
	Reverse: TAT GTA AAC ATC TTA TAT G	38,2	

4.4.2. Amplificação por PCR

Para amplificar estes fragmentos utilizou-se para amplificação por PCR simples a enzima Immolase (Bioline) e em seguida percebeu-se a facilidade de amplificação pela MyTaq PCR, trocando-se assim o *kit* de uso. A escolha pela MyTaq foi feita porque apresenta

uma polimerase que produz produtos de PCR expressos com maior qualidade e menos bandas inespecíficas que as polimerases comuns. Além disso, seu *buffer* minimiza tempo e reações pois não necessita de muitas otimizações para obter resultado.

Para amplificação das sequências 1, 3, 4, 5, 12 foi utilizada a Immolase em uma reação de 50µl contendo Buffer (10x), dNTP Mix (100 mM), MgCl₂ (50mM), Immolase, *primers*, DNA e água.

As sequências 2, 6, 8, 9 foram amplificadas utilizando *Kit* de amplificação por PCR da MyTaq (Bioline). Foi feita uma reação de 50µl contendo Buffer (5x), MyTaq polymerase, *primers*, DNA e água.

Os *primers* (tabelas 2 e 3) foram encomendados na empresa Stab Vida. Eles são enviados liofilizados tendo que ser ressuspensos em água estéril dez vezes o número de nanomoles, fornecendo 100 picomoles de oligonucleotídeos por µl. Todas as informações de bases, quantidade de bases G e C e Temperatura de *Melting* foram fornecidas pela empresa. Para cada reação de técnicas de PCR foi utilizado uma reação em branco (sem amostra) para controle de contaminação com material genético diferente. Para processamento dos ciclos da reação das PCRs foi utilizado o equipamento GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). As condições dos ciclos dependem do *kit* de amplificação utilizado e das temperaturas apresentadas por cada *primer*. Para amplificação das sequências foram seguidas as instruções para otimização dos ciclos (tabela 4) sendo que, para cada par de *primers* foram utilizadas temperaturas de *annealing* específicas.

Tabela 4: Condições dos ciclos de PCR utilizados para cada kit.

	PCR		MyTaq		LongRange	
	°C	Tempo	°C	Tempo	°C	Tempo
Início	95	4'	95	1'	93	3'
Desnaturação	94	1'	95	15"	93	30"
Annealing		1'	40x	15"	35x	1'
Extensão	72	2'	72	10"	68	6'
Extensão Final	72	10'	72	5'		

4.5. Monitorização em gel de agarose

Os produtos obtidos nas PCRs foram visualizados em gel de agarose aplicando 10 µl do produto de PCR junto com 2 µl de Loading Buffer. Os produtos de PCR dos *kits* de PCR e MyTaq PCR foram lidos em um gel a 2%, e os produtos da amplificação por LongRange PCR foram lidos em gel a 1%. Ambos foram feitos com tampão TBE 1x. Ao preparado do gel foi adicionado brometo de etídio (0,5µl/ml) para visualização dos fragmentos em luz ultravioleta. O gel a 2% foi submetido a uma voltagem de 160 V durante aproximadamente 1h30 e o gel a 1% foi submetido a uma voltagem de 120 V durante aproximadamente 2 horas. Os fragmentos no gel a 2% foram lidos comparando com uma amostra de marcador Hyperladder IV (Bioline) e os produtos do gel a 1% foram comparados com um marcador Hyperladder I (Bioline).

Todas as amostras, após leitura em gel, foram analisadas no sistema Nanodrop para contabilização da quantidade de DNA presente (Tabela 5). A quantidade de DNA encontrada em cada amostra se apresentou variável. É sempre difícil encontrar uma quantidade de DNA suficiente de *Pneumocystis* em amostras do trato respiratório. Algumas amostras apresentaram maior quantidade de DNA do que outras. Como todas foram processadas da mesma maneira, isso pode ter ocorrido devido à uma diferença na carga fúngica. Quanto às amostras das sequências 7, 10 e 11, a partir das quais tentou sequenciar grandes fragmentos, obteve-se mínimas quantidades de DNA, muito devido à dificuldade de amplificar estes fragmentos de grandes dimensões e também porque estas amostras foram submetidas à extração de DNA através de gel de agarose, o que dificulta e diminui as hipóteses de se obter DNA em concentração suficiente para sequenciação. A variação e dificuldade na obtenção de amostra satisfatória para trabalho com *Pneumocystis* se deve também ao fato de que estas amostras quando obtidas vêm sempre carregadas de células do hospedeiro, o que acaba contaminando a pureza das amostras e dificultando o processo de obtenção de DNA apenas do micro-organismo.

Tabela 5: Quantificação de DNA em cada amostras pelo sistema Nanodrop.

Sequências	Quantidade de DNA ng/ul
1	26,8
2	42
3	15
4	35
5	56
6	43,6
7	8
8	100,5
9	80
10	8
11	7
12	58,1

4.6.Sequenciação

Após a quantificação de cada amostra, os produtos de PCRs foram enviados, juntamente com amostras dos respectivos *primers* de cada sequência, para serem sequenciados na empresa StabVida. O sequenciamento é feito através de um sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) que reduz a taxa de erros e melhora o comprimento da leitura de sequenciação.

5. Resultados e Discussão

5.1. Análise Bioinformática

5.1.1. *P. carinii* X Outros micro-organismos semelhantes

A comparação entre a sequência do mRNA do β -glucano de *P. carinii* (GenBank: AF291999.1) com outras possíveis sequências semelhantes de diferentes micro-organismos no programa BLAST resultou em uma relação de 16 sequências paralelas de 8 espécies diferentes que se assemelham na ordem dos 70-90% (Figura 7).

Esta análise comparativa foi feita a partir da sequência de mRNA do β -Glucano de *P. carinii*. Os resultados foram 16 sequências tanto de genomas e sequências completas quanto de sequências mRNA.

Nesta análise comparativa pode-se observar que as sequências de espécies muito próximas a *P. carinii*, como *P. murina* e *Saccharomyces castellii*, estão presentes. Estudos comparativos entre sequências de *Pneumocystis* e *Saccharomyces* já mostraram resultados com alta percentagem de identidade entre estes micro-organismos, revelando similaridade genética e reafirmando a colocação de *Pneumocystis* no Reino dos fungos. Para além disso, a identidade em alta percentagem da sequência do β -Glucano, entre quase os mesmos intervalos de base, reafirmam, para além da classificação fúngica, a similaridade entre as espécies. A identidade abaixo dos 100% com a espécie *P. murina* era prevista já que alguns baixos níveis de heterogeneidade genética já foram detectados dentro deste grupo de micro-organismos (Wakefield 1998a; Stringer 1996).

A percentagem de 99% de identidade quando comparado com o gene do β -Glucano de *P. carinii* se deve ao fato de que a base de sequências utilizadas é o transcrito maduro (mRNA), enquanto a sequência comparada é o gene completo do β -Glucano.

Outras sequências que estejam sendo mostradas em duplicado da mesma espécie são da mesma estirpe mas das respectivas representações de gene completo e de mRNA.

A partir destes resultados, foram escolhidas apenas as sequências de mRNA para serem colocadas no programa MultAlin para melhor visualização do trabalho (Figura 9 –

Anexo1). Este programa permite a visualização da sequência em estudo com cores e destaques que melhoram a identificação de semelhança ou diferença entre as bases.

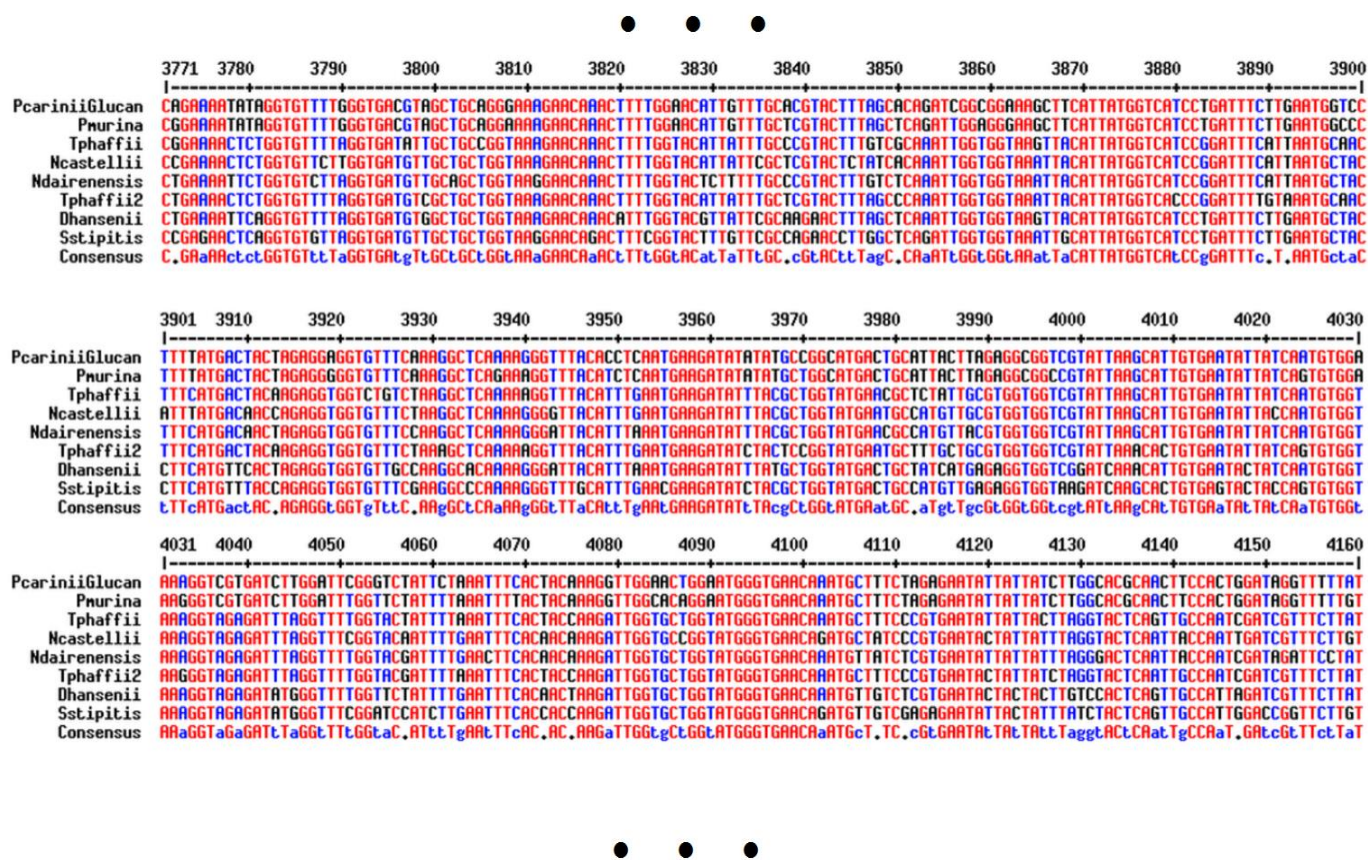


Figura 9: Esquema de visualização do resultado de alinhamento das sequências no programa MultAlin onde podem ser vistas as espécies selecionadas para comparação que se assemelham ao β -Glucano de *P. carinii*. Na imagem podem ser notadas as bases semelhantes em vermelho e as diferentes em azul.

Após esta análise comparativa puderam ser desenhados os *primers forward e reverse* que estão descritos na Tabela 2 para parte do trabalho que consistia em amplificar toda a sequência de uma vez.

5.1.2. Bioinformática a partir de nova análise da sequência genética de *P. jirovecii*

A partir destes resultados e da publicação do sequenciamento completo do DNA de *P. jirovecii* (Cissé et al. 2012), novas direções foram tomadas neste projeto.

Para esta nova etapa, fez-se a análise bioinformática da sequência de mRNA do β -Glucano de *P. carinii* em paralelo com a nova sequência completa de *P. jirovecii*, já que estas

espécies são semelhantes e é comum estudar *P. jirovecii* através de dados disponíveis de *P. carinii*.

O alinhamento entre estas duas sequências fez-se no programa BLAST e, como resultado, foi observado que a sequência do β -Glucano de *P. carinii* se assemelha em 88% ao *contig* (conjunto de segmentos sobrepostos de DNA que em conjunto, representam uma região de DNA) 236 da sequência genômica disponível de *P. jirovecii* (*GenBank*: CAKM01000236.1) (Figura 10).

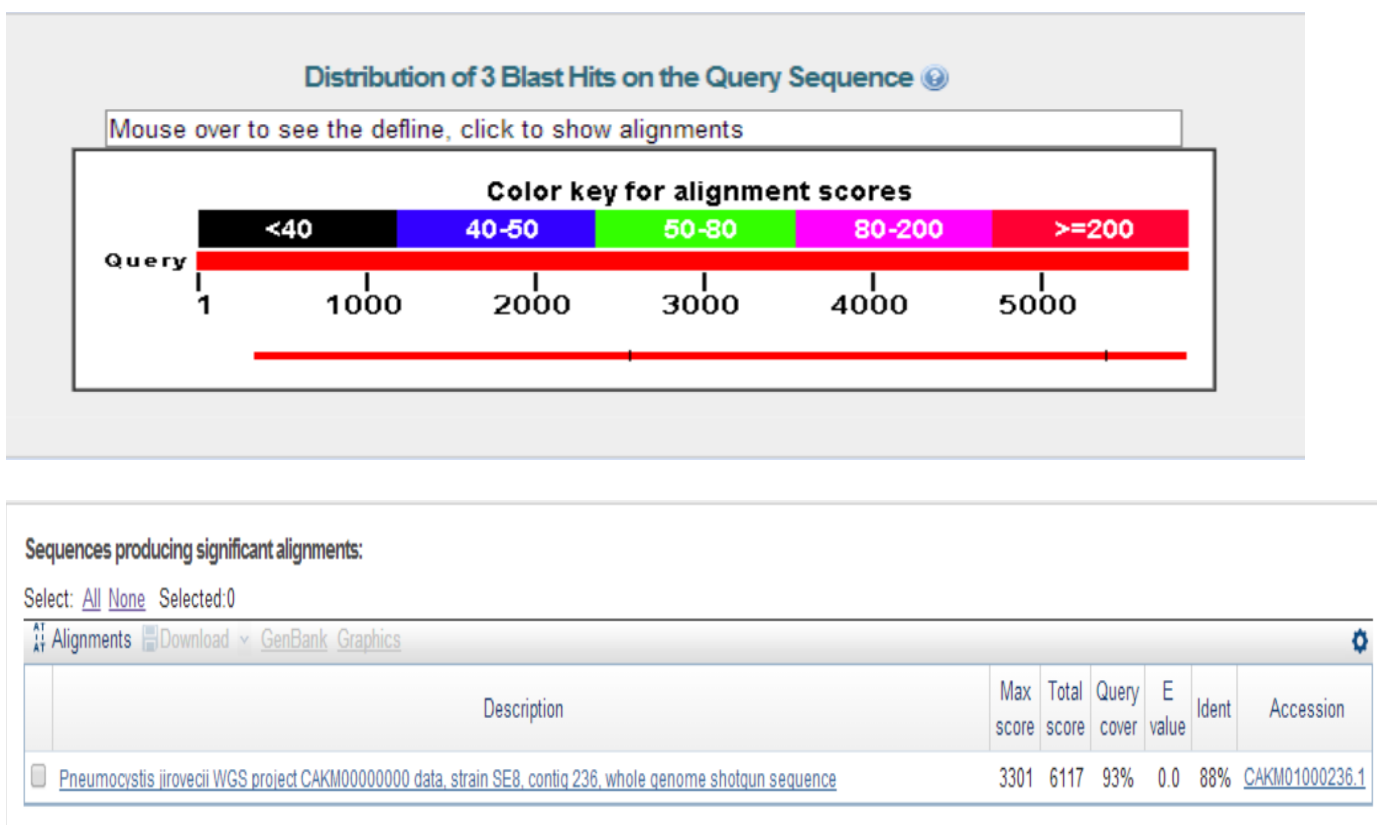


Figura 10: Imagem do resultado de pareamento (BLAST) entre a sequência descrita do β -Glucano de *P. carinii* e a nova sequência disponível do genoma de *P. jirovecii* (*contig* 236). Estas duas sequências se assemelham em 88% em cerca de 6000 bases.

Era esperado que algum fragmento da sequência genômica de *P. jirovecii* se assemelhasse à sequência do β -Glucano de *P. carinii* já que são duas espécies bastante próximas. Encontrou-se esse fragmento no *contig* 236 da sequência onde o β -Glucano emparelha com 88% da sequência.

As duas seqüências foram colocadas no programa MultAlin para melhor visualização das bases pareadas (Figura 11 – Anexo 2).

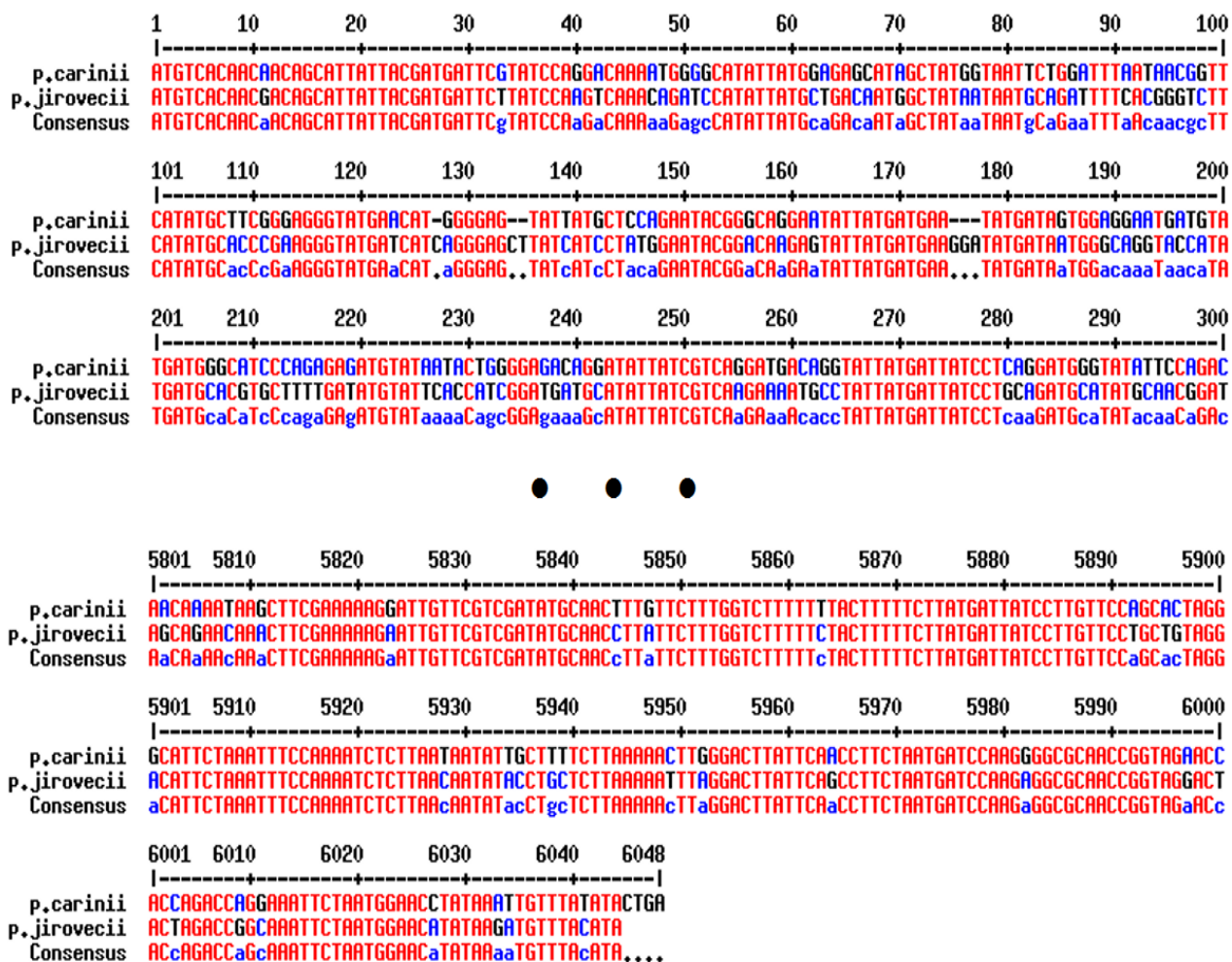


Figura 11: Resultado do emparelhamento das seqüências de β -Glucano de *P. carinii* e do contig 236 de *P. jirovecii* no programa MultAlin. Podem ser notadas as bases semelhantes em vermelho e as diferentes em azul.

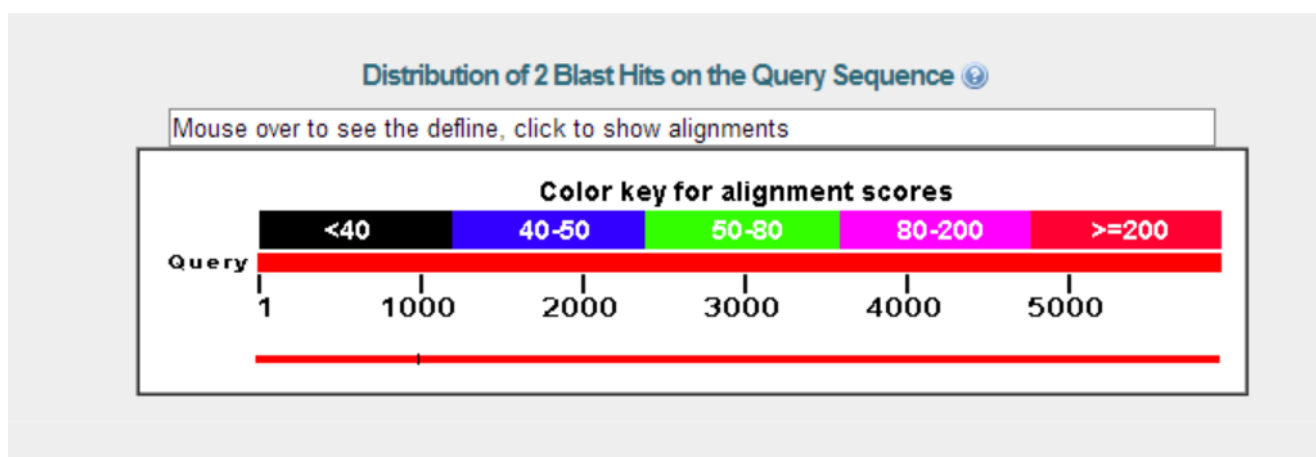
Com esta comparação feita, verificou-se que a seqüência disponível de *P. jirovecii* não possui exatamente o mesmo número de bases que *P. carinii*. O que já era esperado visto que estas duas espécies apesar de próximas não são idênticas e nem mesmo possuem o mesmo genoma, uma vez que são espécies diferentes. Alguns genes são diferentes em suas bases e o β -Glucano pode ser um deles, se apresentando diferente em cada espécie de *Pneumocystis*, para além dos possíveis polimorfismos que podem estar presentes dentro dessas seqüências disponíveis atualmente (Wakefield 1998a).

A partir da análise da sequência do resultado obtido pelo programa MultAlin, foram desenhados *primers* (*Forward* e *Reverse*) para, em fragmentos, realizar a amplificação da sequência proposta da Glucano Sintetase de *P. jirovecii* (Tabela 2).

5.1.3. Análise comparativa da sequência obtida (BLAST)

As diferentes espécies de *Pneumocystis* possuem discrepâncias não só fenotípicas mas também genotípicas (Stringer 1996). Sendo assim as sequências de aminoácidos resultantes das sequências nucleotídicas, tanto do fragmento obtido neste estudo quanto das sequências disponíveis de *P. carinii*, *P. jirovecii* e alguns outros micro-organismos semelhantes, serão divergentes.

Previamente à análise dos aminoácidos fez-se uma comparação (BLAST) entre a sequência obtida neste estudo e a sequência disponível atualmente de *P. jirovecii* na altura do *contig* 236 onde se supõe estar a Glucano Sintetase. Como resultado desse alinhamento obteve-se que a sequência deste estudo se assemelha em 99% ao fragmento do *contig* 236 de *P. jirovecii*, desde a posição de bases 34.985 à 40967 (Figura 12).



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Pneumocystis jirovecii WGS project CAKM00000000 data_strain SE8_contig 236_whole genome shotgun sequence	9046	10877	99%	0.0	99%	CAKM01000236.1

Figura 12: Resultado do alinhamento entre a sequência obtida neste estudo e a disponível atualmente de *P.jirovecii*. O emparelhamento foi de 99%, ou seja, há uma identidade quase completa entre as duas sequências.

Neste caso o pareamento foi de alto valor de identidade visto que são sequências da mesma espécie. Apesar de métodos diferentes de obtenção de DNA nas duas sequências há uma grande percentagem de similaridade no *score* de alinhamento. As pequenas discrepâncias que ocorreram entre as duas sequências podem ser devido ao fato de este micro-organismo divergir genotipicamente não só entre espécies mas também entre estirpes de mesma espécie, como é o caso aqui do *P. jirovecii* (Stringer 1996; Wakefield 1998a).

Entre estas diferenças de bases podem estar incluídos polimorfismos que foram teoricamente identificados (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*). Assim, sugere-se que, no caso de *Pneumocystis*, estes SNPs possam ser determinantes para precisar os fatores epidemiológicos do micro-organismo. Dependendo da colocação desse polimorfismo, se está numa região codificante ou não, a função gênica ou a estrutura proteica podem ser alterados (Esteves et al. 2010).

Para além da comparação com a sequência de *P. jirovecii* foi feito também um alinhamento com outras sequências de micro-organismos semelhantes (Figura 13).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Pneumocystis carinii 1,3-beta-glucan synthase GSC-1 gene, complete cds	3866	6182	99%	0.0	88%
Pneumocystis murina B123 hypothetical protein partial mRNA	3402	6451	92%	0.0	89%
Pneumocystis carinii beta-1,3-glucan synthase GSC-1 mRNA, complete cds	3286	5607	81%	0.0	88%
Candida dubliniensis CBS:7987 1,3-beta-D-glucan synthase subunit 1 gene, complete c	835	835	34%	0.0	75%
Candida dubliniensis CD36 1,3-beta-D-glucan-UDP glucosyltransferase, putative (CD36	835	835	34%	0.0	75%
Candida dubliniensis CD36 chromosome 1, complete sequence	835	835	34%	0.0	75%
Candida albicans SC5314 beta-1,3-glucan synthase (CaO19_2929) partial mRNA	747	747	33%	0.0	74%
Candida albicans SC5314 beta-1,3-glucan synthase (CaO19_10446) partial mRNA	747	747	33%	0.0	74%
Candida albicans strain 23002 beta-1,3-glucan synthase catalytic subunit (GSC1) gene,	743	743	26%	0.0	76%
Candida albicans GSC1 gene for beta-1,3-glucan synthase catalytic subunit 1, complete	743	743	26%	0.0	76%
Candida albicans strain ATCC 90028 beta-1,3-glucan synthase catalytic subunit (GSC1)	739	739	26%	0.0	76%
Tetrapisispora blattae CBS 6284 hypothetical protein (TBLA0A08870) mRNA, complete c	689	689	26%	0.0	75%
Tetrapisispora blattae CBS 6284 chromosome 1, complete genome	689	689	26%	0.0	75%
Tetrapisispora phaffii CBS 4417 hypothetical protein (TPHA0F01030) mRNA, complete c	667	667	25%	0.0	75%
Tetrapisispora phaffii CBS 4417 chromosome 6, complete genome	667	667	25%	0.0	75%
Tetrapisispora blattae CBS 6284 hypothetical protein (TBLA0G01310) mRNA, complete c	641	641	19%	2e-179	77%
Tetrapisispora blattae CBS 6284 chromosome 7, complete genome	641	641	19%	2e-179	77%
Candida albicans 1,3-beta-D-glucan synthase catalytic subunit (CaFKS1) gene, partial c	494	494	17%	6e-135	76%
Kazachstania naqanishii CBS 8797 chromosome 4, complete genome	379	379	23%	2e-100	72%
Candida tropicalis MYA-3404 1,3-beta-glucan synthase component bqs2, mRNA	318	318	12%	4e-82	75%
Millerozyma farinosa CBS 7064 hypothetical protein (Piso0_001506) mRNA, complete cc	235	235	11%	4e-57	73%
Pichia sorbitophila strain CBS 7064 chromosome E complete sequence	235	235	11%	4e-57	73%
Saccharomyces cerevisiae YJM993 chromosome XIII genomic sequence	86.1	86.1	1%	5e-12	82%
Saccharomyces pastorianus breakpoint (sacCer2; chrXIII:882708-882717), strain DBVP	86.1	86.1	1%	5e-12	82%
TPA: Saccharomyces cerevisiae S288c chromosome XIII, complete sequence	86.1	86.1	1%	5e-12	82%
Saccharomyces cerevisiae S288c Fks3p (FKS3), mRNA	86.1	86.1	1%	5e-12	82%
Saccharomyces cerevisiae EC1118 chromosome XIII, EC1118_1M3 genomic scaffold, v	86.1	86.1	1%	5e-12	82%
S.cerevisiae chromosome XIII cosmid 9952	86.1	86.1	1%	5e-12	82%
Vanderwaltozyma polyspora DSM 70294 hypothetical protein (KpoI_1028p64) partial mR	76.8	76.8	1%	3e-09	86%

Figura 13: Resultado do alinhamento entre a sequência obtida neste estudo e outras sequências semelhantes disponíveis no GenBank.

Como resultado deste alinhamento foram obtidas 29 sequências de 13 micro-organismos diferentes dando relevância às sequências de β -glucano alinhadas, todos na ordem dos 72 – 89%. O β -Glucano é o principal componente da parede celular de muitos fungos e parece ser geneticamente análogo entre a maioria (Shapiro et al. 2004).

Podem ser notadas tanto sequências genômicas completas quanto suas sequências de mRNA. O importante aqui são os resultados comparativos com mRNA que indicam a efetividade da sequência proposta neste estudo. Ainda foi dada atenção às percentagens de identidade com as sequências de mRNA de beta-1,3-glucano de *P. murina*, *P. carinii*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

5.1.4. Análise da sequência proteica resultante da sequenciação

A sequência de nucleotídeos do contig 236 de *P. jirovecii* resulta em uma sequência de aminoácidos. Da mesma maneira, a partir da sequência obtida neste estudo, através do programa BLASTX (Disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastx&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), conseguiu-se traduzir a sequência de nucleotídeos obtida em aminoácidos (Figura 14).

```
DPYGMPIADQHPLQYFQDHGNYMYNRKKGKHRGSSEGSEAFSDFTMRSDMARAAE
FDA YGRFDEQYRSYAPSTESLNQMASRRGYYPDSSQISYTGNRSSGASTPVYGME
YNQAAMMTSARSREYPAWTAENQIPISKEEIEDIFIDLTKFGFQRDSMRNMYDH
MMVLLDSRASRMTPNQALLSLHADYIGGDNANYRNWYFAAQLDLDLDAVFSQKN
TTAKDILQALESDNPLES AIYRWKTKCSQMSQYDRARELALYLLCWGEANQVRF
PECLCFIFKCAN DYLN SPQCQAMVEPVPEGSYLNDIITPLIYIMRDQGYEIIINGKYV
RRERDHNKIIGYDDINQLFWYSEGIERIVLSDKTRIIDLPEQRYLRLKDVVWKKVF
FKTYRETRSWFHLFTN FNRIWIIHITVYWFYTAANSPTVYTHNYQQSLDNQPPFAY
RMSAVSFGGGVASLLMIIATLAEWAYVPRKWAGA QHLTRLLFLILFLIINVAPGV
YVIKFAPWKPKVSVVTTLISIIHFLIAMFTFLFFAIMPLGGFLGNYLYKKTRRYVASQ
TFTANFAKLKGNLWLSYGLWIAVFACKFAESYFFLSLSLRDPIRYLNTMTIGHCGI
RYLGSILCPYQAKITLGIMYITDLVLF LD TYLWYIHWNTICSVARSFYLGVSIWTPW
RNIFSRMPKRIYSKILATNDMEIKYKPKVLISQVPSEQEGKRTLRAPTFFISQEDHSF
KTEFFPSHSEAERRISFFAQSLSTPIPEPLVDNMPTFTVLVPHYGEKILYSLREIRED
DQLSRVTLLEYLQQLHPVEWDCFKDKTILAEETSLYNGGSSFDKDEKDTVSKIID
DLPFYCVGFKSAAPEYTLRTRIWASLRSQTLYRTVSGFMNYSRAIKLLYRVENPDV
VQMF GGNTDKLEHELMARRKFKFVISMQRFFKFNKEEQENTEFLLRAYPDLQI
AYLDEPPSHEGDEPKIYSSLIIDGYSEIME
```

Figura 14: Sequência de aminoácidos resultante da tradução de nucleotídeos do fragmento obtido neste estudo. Dessa tradução resultou uma sequência de 987 aminoácidos.

A partir da obtenção dessa sequência começou-se por compará-la, através do programa BLASTP (Disponível em: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) à sequência do β -Glucano de *P. carinii* e com o contig 236 de *P. jirovecii* na sequência de bases 34.984 à 40.978 (onde supostamente codifica para a Glucano Sintetase) (Figuras 15 e 16).

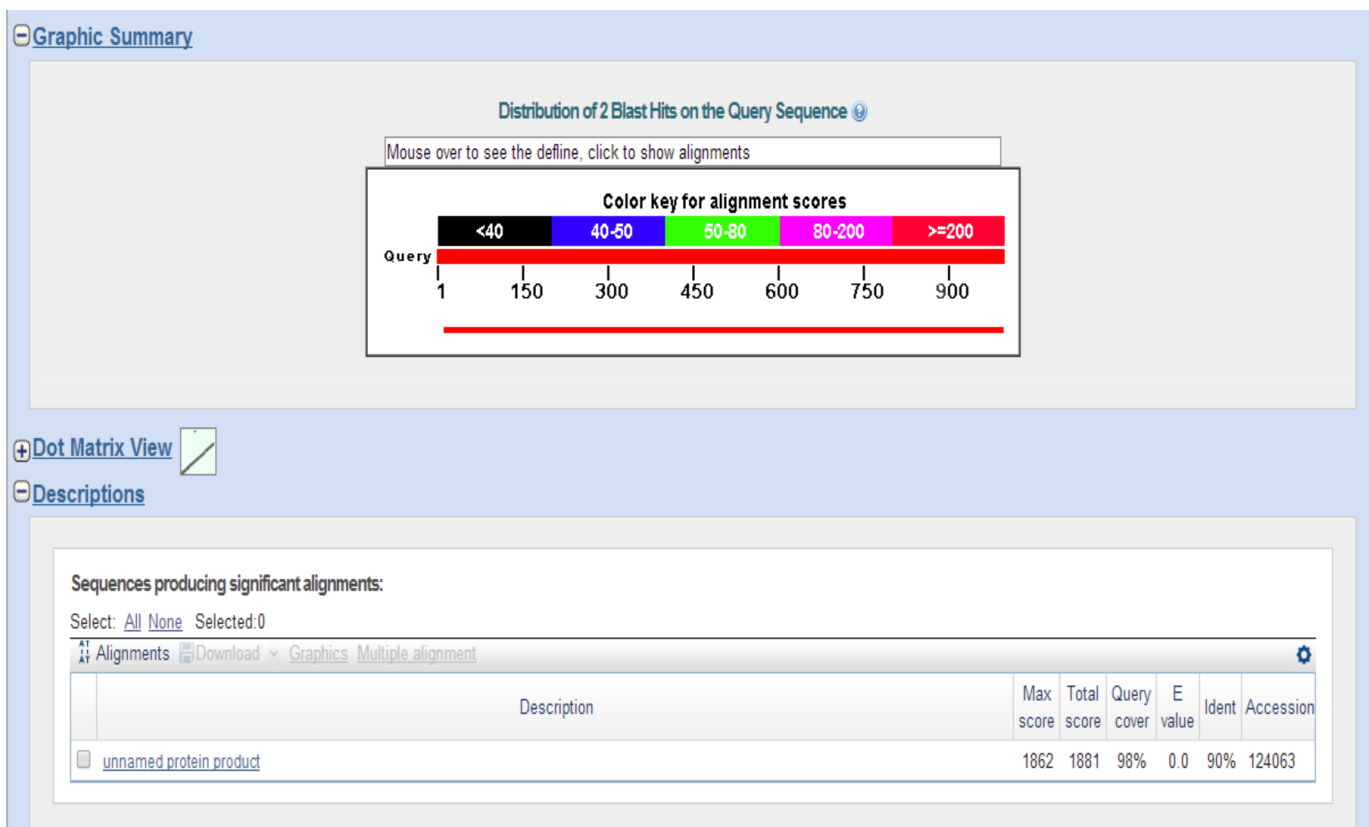


Figura 15: BLASTP entre as sequências de aminoácidos da sequência obtida neste estudo e da sequência do β -Glucano de *P. carinii*. O resultado foi uma homologia de 90%.

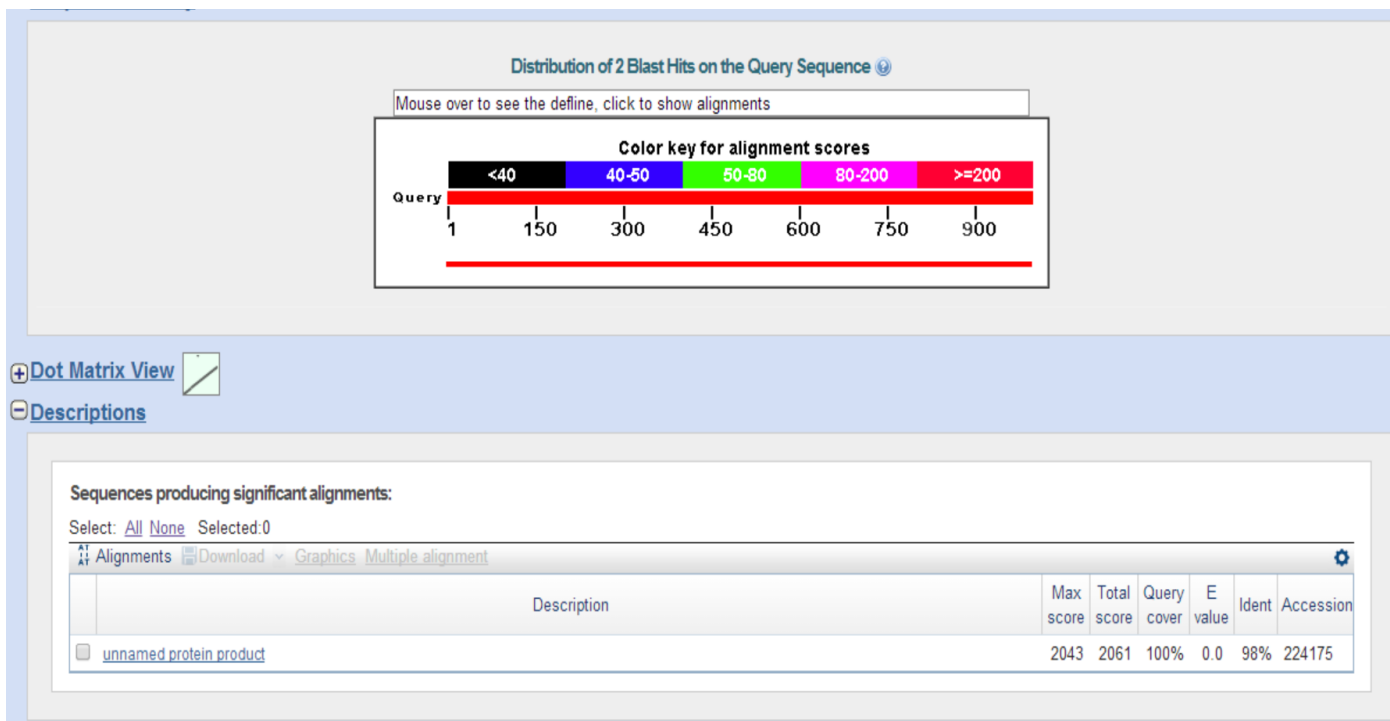


Figura 16: BLASTP entre a sequência de aminoácidos obtida neste estudo e a sequência de *P. jirovecii* onde se encontra possivelmente localizado o β -Glucano.

A homologia entre essas sequências é evidente visto que pertencem ao mesmo grupo. A quase idêntica semelhança entre a sequência obtida neste estudo e a de *P. jirovecii* revela a relação entre elas. A possível discrepância de 2%, como já foi dito, com os aminoácidos pode ser devido a polimorfismos presentes na sequência nucleotídica que, conseqüentemente, alteram a sequência de aminoácidos.

Um dos principais objetivos de análise da sequência de aminoácidos é compreender a função da proteína a partir de informações da sequência. Uma das principais abordagens é classificá-la através de seus principais domínios e estrutura tridimensional. Os domínios são unidades de conservação em proteínas e frequentemente correspondem a unidades estruturais e funcionais recorrentes.

Utilizando informações obtidas neste mesmo programa (BLASTP) pode-se ter uma análise das regiões conservadas da sequência obtida neste estudo, do β -Glucano de *P. carinii*, de *P. jirovecii* e de *Saccharomyces* (um fungo relativamente próximo de *Pneumocystis*) (Figuras 17, 18, 19 e 20).

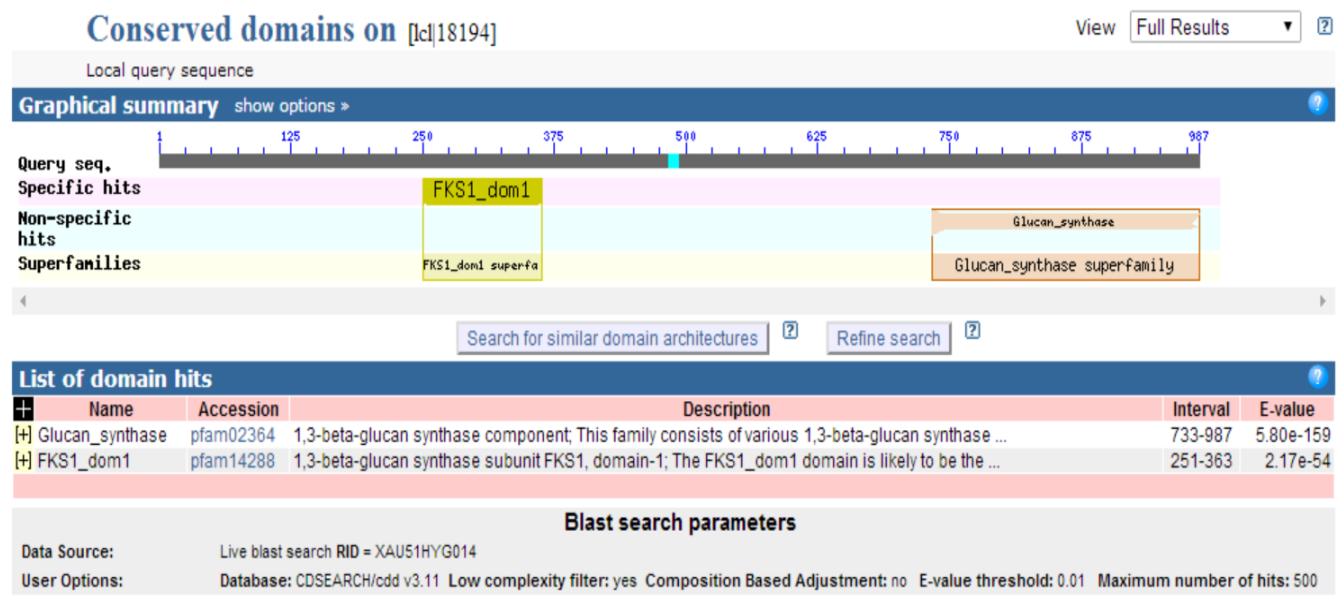


Figura 17: Como resultado da procura de domínios conservados na sequência de nucleotídeos, obtiveram-se quatro regiões chamadas de FKS1 (1) e Glucano Sintetase(3). Os domínios encontrados são codificados pelos fragmentos situados entre posições indicadas em Interval para que possam ser localizadas na sequência.

As proteínas em geral contêm um ou mais domínios sendo que cada um deles pode evoluir independentemente do resto da estrutura da proteína contendo funções únicas. Por conta da evolução molecular muitas vezes algumas proteínas com sequências similares compartilham de mesma estrutura. Comparar um domínio de uma proteína em um banco de dados de proteínas é uma tarefa crítica para a análise da estrutura, função e evolução dessa proteína (Wang et al. 2012)

A sequência analisada na possível região do β -Glucano mostra dois domínios conservados, o FKS1 e Glucano Sintetase. O domínio FKS1 codifica uma proteína integral de membrana de 215-k-Da como sendo a maior subunidade do complexo da Glucano Sintetase e é provável estar na região de Classe 1 no N-terminal para o primeiro conjunto de hélices transmembranares que estão envolvidas na síntese de 1,3- β -glucano. Esta família é encontrada em proteínas como da Glucano Sintetase (pfam 02364).

A pfam02364 é um componente não específico da 1,3- β -glucano sintetase. Essa família consiste de vários componentes incluindo o Gls1, Gls2 e Gls3 de fungos. A glucano sintetase catalisa a formação do polímero de 1,3- β -glucano, componente mais abundante na

parede celular de fungos. A reação de catalização é: -UDP- glicose + 1,3-β-D-glucosil (N) ⇌ UDP + 1,3-β-D-glucosil (N+1).

Membros da mesma família Pfam devem apresentar uma história de evolução semelhante e resguardar alguns aspectos funcionais. Apresentam unidades funcionais que, quando combinadas, geram proteínas específicas (Punta et al. 2012).

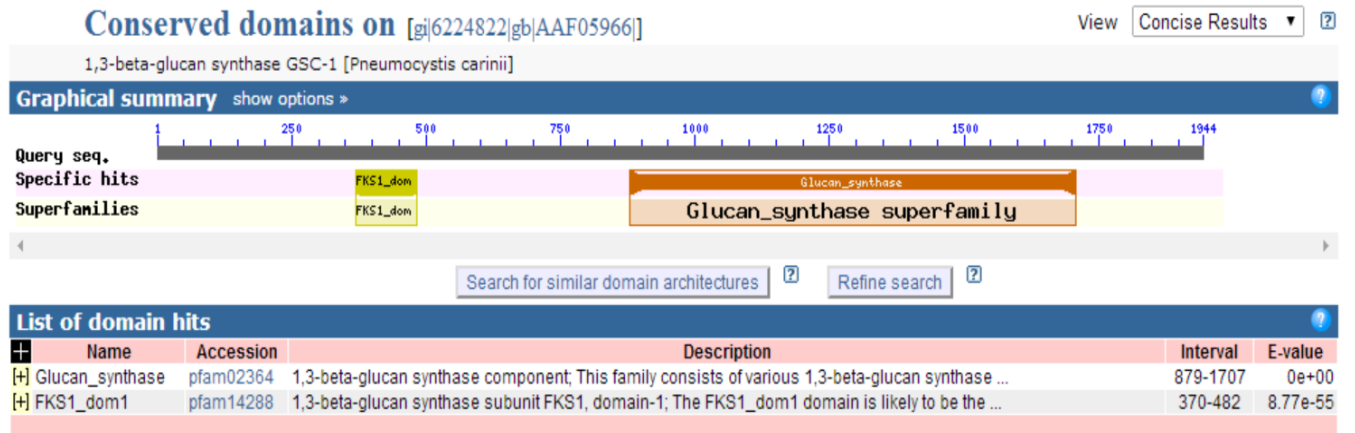


Figura 18: Imagem resultante da pesquisa de regiões conservadas na sequência do β-Glucano de *P. carinii*. Podem ser observadas as mesmas regiões conservadas da sequência elaborada neste estudo.

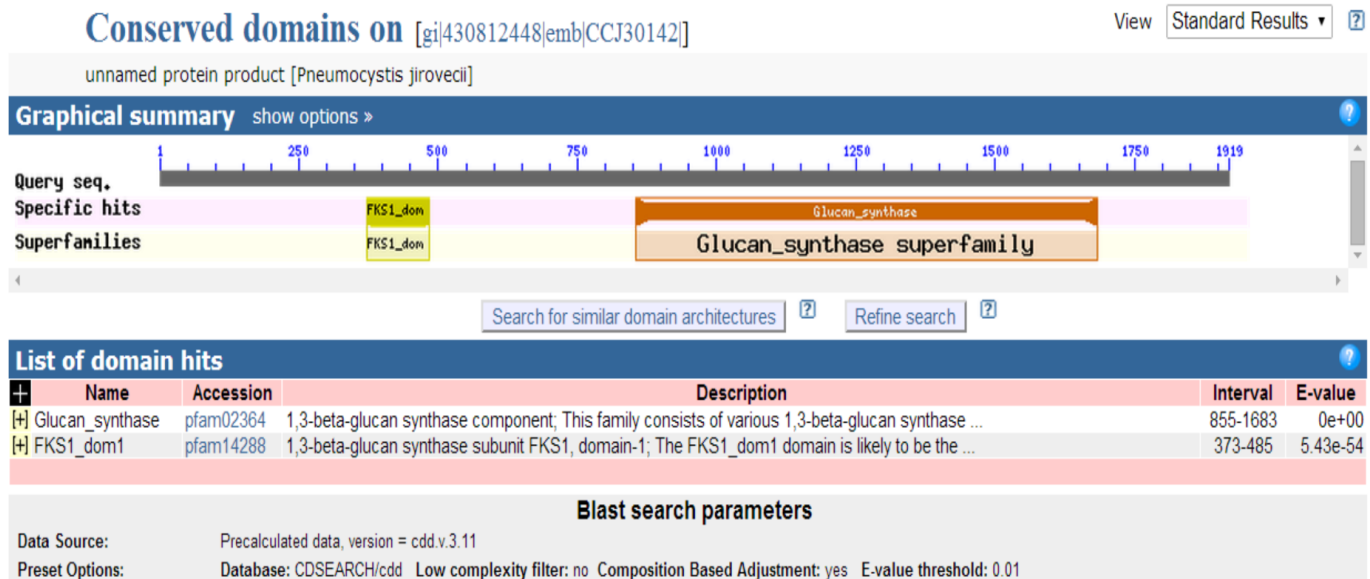


Figura 19: Resultado da procura por regiões conservadas no contig 236 de *P. jirovecii* entre as bases 34.984 à 40.978.

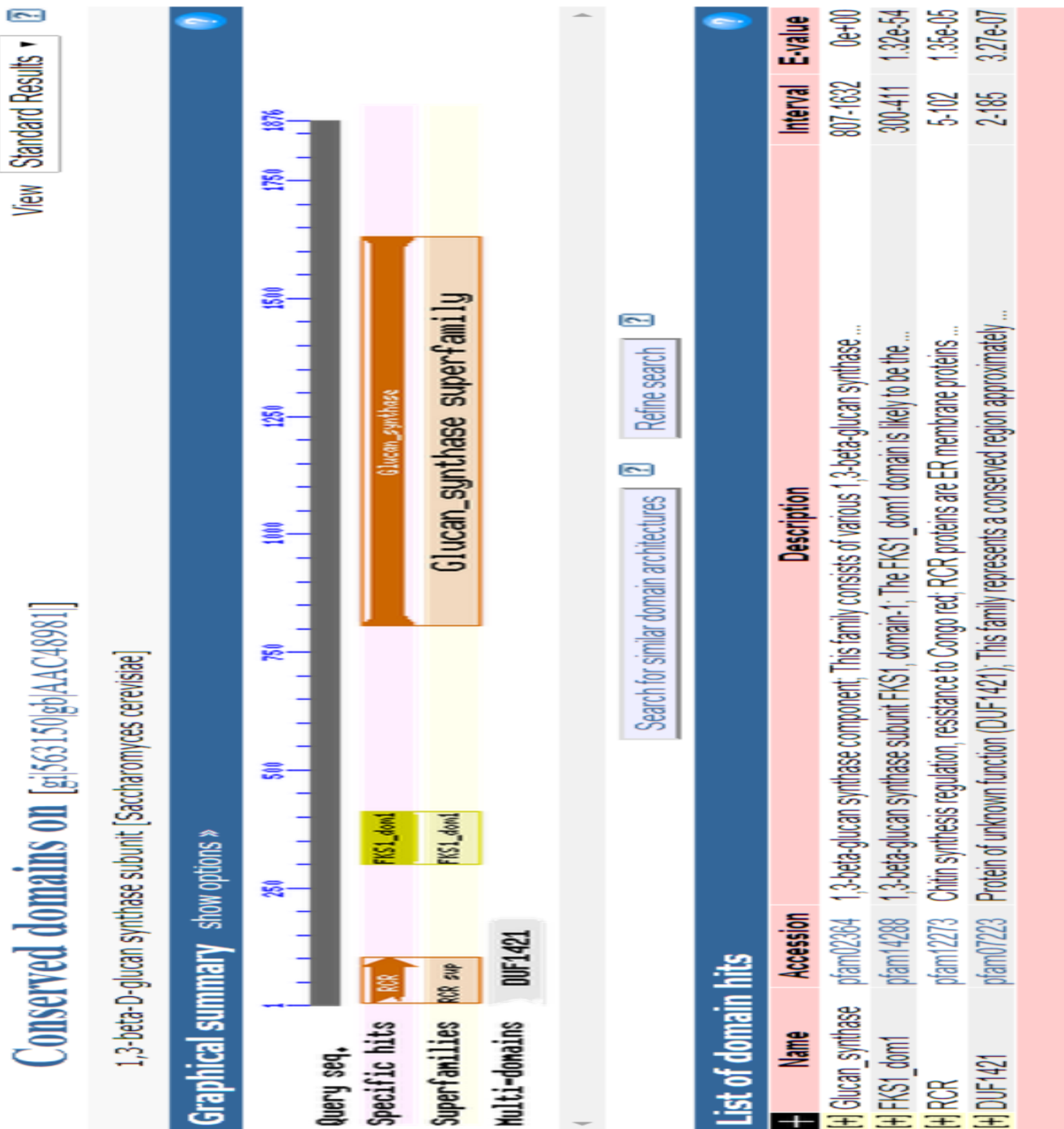


Figura 20: Representação do resultado do BLASTP do 1,3-β-D-Glucano de *S. cerevisiae* (UniProtKB/Swiss-Prot: P38631.2).

Com base nos resultados obtidos pela busca de domínios conservados pode-se observar que as quatro seqüências se apresentam semelhantes, com os mesmos domínios (FKS1 e Glucano Sintetase).

O componente predominante da parede celular de fungos ascomicetos (como *Pneumocystis* e *Saccharomyces*) é o β -1,3-Glucano. Este, tem papel importante na imunidade e no diagnóstico. Em vários fungos estudados, tem sido demonstrado que o FKS1 é essencial para a viabilidade fúngica. Para além disso, a síntese do β -glucano tem sido estudada como potencial alvo terapêutico. As equinocandinas (inibidores da síntese do β -glucano) inibem a incorporação do substrato UDP. Esse substrato é citosólico com produção externa necessitando de um complexo de proteínas membranares. Esse complexo parece estar limitado a uma quantidade pequena de proteínas como o FKS1 (proteína integral) e Rho1. Para além da viabilidade celular, o FKS1 parece estar intimamente relacionado como a resistência às equinocandinas. (Johnson & Edlind 2012).

Apesar das pequenas diferenças entre bases nucleotídica foram mantidos os mesmos domínios conservados, característicos nas outras sequências semelhantes de outros micro-organismos da mesma espécie que *Pneumocystis* e de outras espécies como *Saccharomyces*, validando a correlação entre estes micro-organismos e a indubitabilidade na amplificação da sequência da Glucano Sintetase.

Como foi dito anteriormente, essas diferenças nucleotídicas podem ser fruto de SNPs na sequência. Alguns SNPs já foram identificados em alguns genes de *P. jirovecii* como o subunidade maior mitocondrial (mtLSU), RNA ribossomal (rRNA), citocromo B (CYB), superóxido dismutase (SOD), dihidrofolato redutase (DHFR) e dihidrofolato sintetase (DHPS), e no gene da Glucano Sintetase pode não ser diferente (Esteves et al. 2010).

Um outro problema em relação à diferença nucleotídica resultante em pequenas divergências na sequência de aminoácidos é também a forte presença de células do hospedeiro nas amostras de DNA. O DNA do hospedeiro causa grandes dificuldades para amplificar o fragmento pretendido do micro-organismo, primeiro por estar em maiores quantidades e depois interfere na obtenção de bandas únicas e limpas em gel de agarose. Pela sua maior quantidade há sempre pequenas perturbações em relação à obtenção de resultados puros.

5.2.Otimizações e resultados da LongRange PCR

Foram feitas as otimizações necessárias para cada amplificação de acordo com as instruções do fabricante com o *kit* de LongRange PCR. O *kit* foi escolhido pelos longos fragmentos obtidos para amplificação. Após a execução da técnica de PCR obtivemos dois resultados válidos. As duas amplificações deram origem a bandas múltiplas quando foram lidos em gel de agarose, a banda esperada mais bandas inespecíficas (Figura 21 A e B).

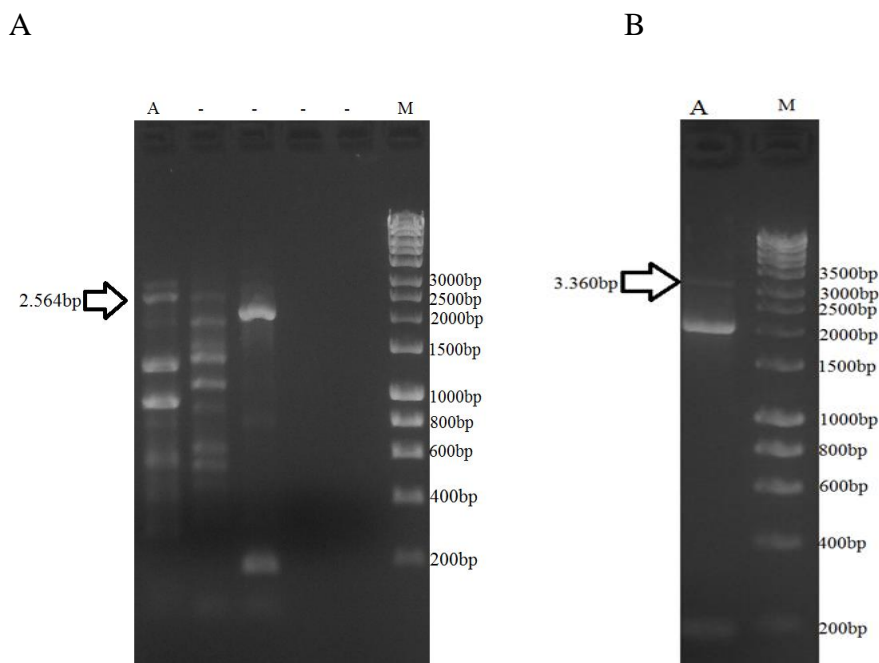


Figura 21: O resultado da amplificação de dois fragmentos visualizados aqui em gel de agarose mostra as bandas pretendidas de 2.564 bp em A e de 3.360 em B. As duas imagens apresentam, para além das bandas pretendidas, outras bandas inespecíficas.

É importante ressaltar que a amplificação da sequência completa não pode ser concluída, pois a amplificação de grandes fragmentos com 5 Kb é mais complexa.

Após a visualização dos resultados foi feita a purificação das amostras para a retirada das bandas não pretendidas. Para tal, utilizou-se o *kit* de Extração de Gel (Qiagen), executando-o de acordo com as instruções do fabricante, do modo já descrito em “Material e Métodos”. As bandas pretendidas nas amostras em estudo foram então encaminhadas para sequenciamento (Figura 22 A e B).

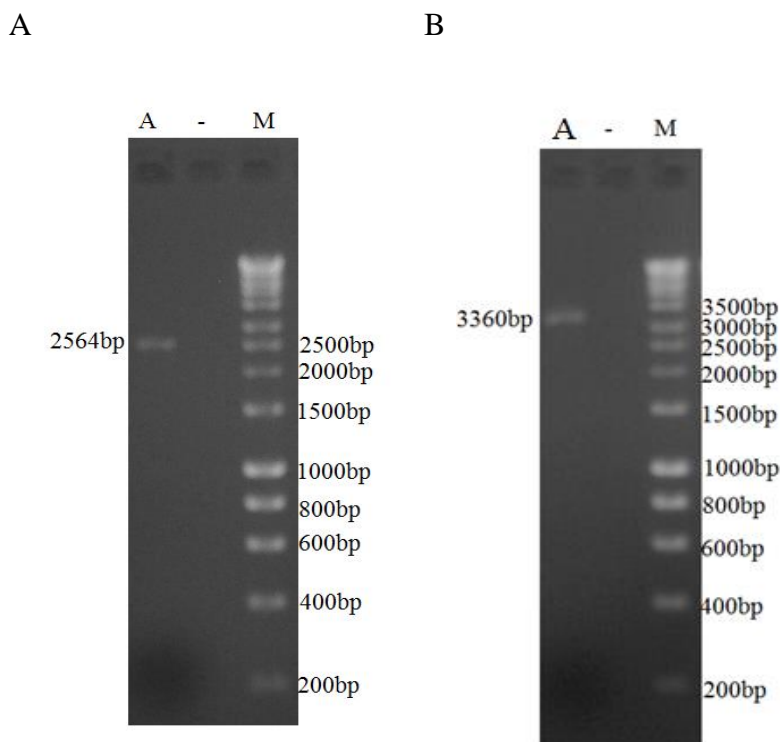


Figura 22: As bandas pretendidas puderam ser isoladas quando visualizadas em gel de agarose, mostrando assim a pureza das amostras para que pudessem ser enviadas para sequenciamento sozinhas.

As sequências obtidas foram referenciadas como 7 e 10 (2.564 bp) e 11 (3.360 bp). As bandas obtidas nestas amostras eram de difícil leitura, pois já estava previsto que amostras não procedentes de produtos brutos de PCR seriam difíceis de serem lidas. As amostras foram enviadas juntamente com seus respectivos primers.

O resultado do sequenciamento revelou três sequências nucleotídicas com cerca de 500 pb cada. Eram esperados dois fragmentos de cerca de 2500 bases mas com as dificuldades de sequenciamento previstos pós extração de DNA em gel, isso não ocorreu. A banda pretendida de 2.564 pb não foi obtida no sequenciamento. Já a banda de 3.360 pb revelou três sequências não seguidas de cerca de 500 pb (Figura 23). Sendo assim, ela não foi sequenciada completamente. Como já foi dito anteriormente, essa falha no sequenciamento se deve não só à dificuldade de se amplificar longos fragmentos, mas também à etapa de extração de DNA pelo gel de agarose, que se previa falhar no processo de sequenciamento. Outros fatores para a dificuldade no sequenciamento podem ser dificuldade na obtenção de DNA e/ou contaminação por DNA do hospedeiro.

Clone 7 – 653 bp

TTTATATTCTTTGCGAGAAATTATACGTGAAGATGATCAACTTTCGAGAGTAACACTAC
TAGAATATCTTAAACAATTGCATCCTGTAGAATGGGATTGCTTTGTCAAGGATACCAA
ATATTGGCAGAGGAAACTTCTCTTTATAATGGAGGATCATCTTTTGATAAAGATGAAAA
AGACACAGTAAAAAGCAAATTGACGATTTACCTTTTTATTGIGTTGGATTCAAATCAG
CAGCACCAGAATATACCTTAAGGACACGTATTTGGGCATCATTGCGTTCTCAAACCTTA
TACAGAACTGTTTCTGGATTTATGAACTATTCACGAGCTATTAAGCTTCTTTATCGTGTT
GAAAATCCTGATGTTGTTCAAATGTTGGTGGAAATACAGATAAGTTAGAACATGAGT
TAGAAAGAATGGCCCGTCGGAAATTCAAATTTGTTATATCAATGCAACGATTTTTTAAA
TTCAATAAAGAGGGAGCAAGAGAATACGGAATTTCTTCTCGGGCCTATCCAGATCTTCA
AATTGCATATTTGGATGAAGAGCCGCCTTCACATGAAGGAGATGAACCAAAAATATAT
TCATCTTAATAGATGGATATTCGGAGATTATGGAAGATGGTAGACGACGACCAAAG
TTTAGA

Clone 10 – 941 bp

TATGTTTTTTTTATTGCATTTATACCTCTANTTGTTCAGAGTTAACTGAAAGAGGTGTA
TGGAGGGCCTCTACACGACTTGCTAAACATTTTGGTTCANATATCGCCTTTATTTGAAGT
GTTTGTCTCAAATTTATGCTAATCTTTACTCCAAAATCTTGCATTTGGAGGTGCTCG
ATATATTGGTACTGGTCGTGGATTTGCAACTACTAGAATCCCATTTCAATACTTTTTTC
AAGGTTTGTGGTGCATCTATATATTTGGGTTACGCACTCTTATTATGCTCTTGTTC
AACAGTTACTATGTGGATACCTCATTTAGTATACTTCTGGGTTTCAGTGTTAGCACTTTG
TATANGCCCATTTATTTTTAATCCACACCAGTTTTCATGGACTGATTTCTTTGTGGATTA
TAGAGAATTTATTCGCTGGTTATCTCGTGGTAATTCCAGATCTCATGCAAATTCATGGA
TAGGTTATTGTCGTTTATCCAGAACTAGAATAACAGGATTCAAACGAAAAGCTCTTGG
ACAGCCATCAGAGAACTTTCAGGTGATATTCCTAGGGCAGGATTTAACAATGTTTTTT
TTAGTGAAGTTATCGGGCCATTGATCTTAGTAATTTTGTCACTTGTTCCATTTTGTTC
TGAATTCACGGCCTGGATTTGAACCATTTGGTAAATCAAATCCAGCTCGAAACGGTTCA
AATCCTTAATTCGATTGCGATTGTTTCATTTGCTCCGATTTGTGTTAATGCATTGGTG
GCCTTTGTGTTTTTCGGTATGGCATGTTGTATGGGTCCAATTTAACTATATGTTGTAAA
AAATTTGGAGCAGTTTTAGCAACTATTTCTCATGCAATAGCTGTAATAGTCTTAGTAGC
GTTTTTTGAAGTTTTATGGTTTAGAGGGATGGTCTTTTTCCAAAATA

Clone 11 – 449 bp

ATAGCTGTAATAGTCTTAGTAGCGTTTTTTGAAGTTTTATGGTTTTTAGAGGGATGGTCT
TTTTCCAAAACATTTTAGGATTAGTTACTATGATTTCTCTTCAACGGGCTTTCTTAAAA
ATGTTAACAATAATGATTCTTACTCGTGAATTTAAACATGATGGGTCTAATTTAGCATG
GTGGTATGTGATTTTTCAAAAACTTTAAGTTTGACAATTCTAGGACGGGACGATGGT
ATAGTAATAACTTAGGCGTTCATGCTATGTCTCAACCTGCTCGAGAATTTGTCTGCAA
GTTATAGAATTATCTCTATTTGCTGCAGATTTTTGCCTTGGACATTTGTTATTGTTTATC
CTCACTCCCATATTGGCTATACCTTATATTGATCGCTGGCATTCTATGCTTTTATTTGG
CTTCGACCTTCTCGACAAATTCGACCACCTAT

Figura 23: Resultado do sequenciamento das amostras obtidas por LongRange PCR. O resultado não se mostra satisfatório pois eram esperadas seqüências maiores do que as apresentadas. Porém, o resultado era esperado visto as dificuldades de sequenciamento de amostras provenientes de corte em gel.

A sequência 7, representada por 653 bases amplificadas, situa-se entre as posições 2896 e 3547 na sequência de 5994 bases. Comparando essa sequência com as bases de *P. jirovecii* notou-se que este resultado de sequenciamento possui uma base adenina a mais na posição 3518. Já a sequência 10, situada entre as posições 4421 e 5363 apresentou duas bases trocadas nas primeiras posições (TA ao invés de AT), para além de outras bases não identificadas no sequenciamento, indicadas pela letra N (Figura 24). A sequência 11, situado entre as posições 5291 e 5739, abrangendo 449 bases, não apresentou nenhuma diferença entre as bases quando comparado com a sequência de *P.jirovecii*.

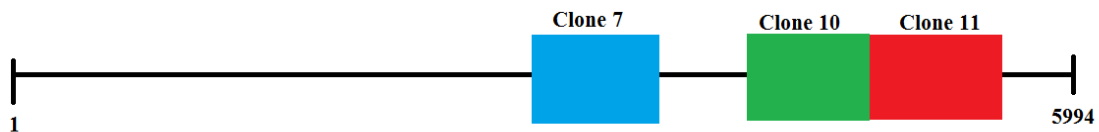


Figura 24: Mapa ilustrando as posições das sequências 7, 10 e 11 com base na sequência de 5994 bases.

5.3.Resultados das reações de PCR

Todos os pares de primers utilizados na amplificação devem resultar em sequências com, aproximadamente, 500 pb (Tabela 6). As imagens (anexos 4 a 12) mostram as bandas pretendidas, conseguidas através de PCR e visualizadas em gel de agarose. Os primers desenhados, localizados com base na comparação com a sequência genética do *P. jirovecii* descrita por Cissé OH *et al* (Cissé *et al.*, 2012), que quando comparada com β -glucano de *P.carinii* nos mostra uma certa quantidade de pares de base entre os primers, são contabilizados de acordo com a sequência nucleotídica obtida neste estudo de 5.994 bases.

Tabela 6: Quantidade de pares de base esperados para cada sequência amplificada de acordo com a posição de seus *primers*.

Sequências	Quantidade de pb esperadas
1	560
2	535
3	620
4	622
5	495
6	644
7	2564
8	619
9	673
10	2564
11	3360
12	577

O desenho dos primers foi feito de maneira a amplificar a sequência completa de *P. jirovecii* na série de bases que correspondem ao β -glucano. Um mapa das sequências amplificadas foi desenhado (Figura 25).

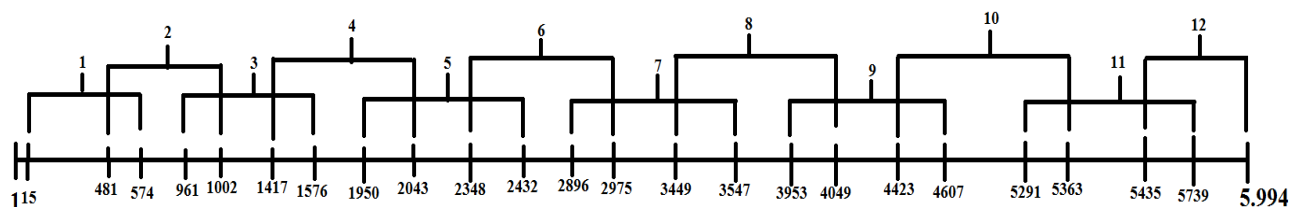


Figura 25: Mapa global das sequências amplificadas. Cada sequência está representada por um número em série na linha que representa a sequência de bases e suas posições de acordo com a sequência obtida na bioinformática como referência à possível posição do β -glucano de *P. jirovecii*. Foram amplificadas um total de 12 sequências sendo que suas posições representam a sequência amplificada com início no *primer* escolhido *forward* e fim no *primer reverse*.

Após obter resultados positivos dos produtos de PCR, com visualização das bandas desejadas em gel de agarose, o passo seguinte foi enviar as amostras para

sequenciamento para a empresa StabVida. Cada sequência resultou em um fragmento com aproximadamente o número de bases esperado.

Com o resultado da análise comparativa entre as sequências forward e reverse e a sequência descrita de *P. jirovecii* puderam ser feitas algumas observações (Anexo 14).

As técnicas utilizadas neste estudo, em comparação com o estudo de Cissé *et al.*, 2012, são diferentes. Aqui obtivemos o DNA do micro-organismo de maneira mais simples e, em um segundo passo, como tínhamos a sequência já descrita de *P. jirovecii*, pudemos localizar onde a sequência do β -glucano se encontrava e em seguida amplificar e sequenciar. Já no estudo de Cissé *et al.*, 2012 foram utilizadas outras técnicas para a obtenção do DNA de *P. jirovecii* e sua subsequente amplificação e sequenciação.

O primeiro passo de Cissé *et al.*, 2012, foi a escolha das amostras, tendo por preferência aquelas com volume suficiente (mais de 1 ml) e com alta carga fúngica, foram escolhidos quatro lavados broncoalveolares (LBA). Em seguida fez-se o enriquecimento dessas amostras com imunoprecipitação. A amplificação do DNA foi feita com o *kit* da QIAamp[®] DNA Mini *kit* (QIAGEN) e 1 μ l de DNA foi aleatoriamente amplificado utilizando o *kit* Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification *Kit* (GE Healthcare). O DNA foi extraído, amplificado e sequenciado por pirosequenciamento Roche 454. Cada resultado de LBA positivo para *P. jirovecii* foi agrupado em conjuntos para verificação da presença de outros *Pneumocystis* ou fungos que não *P. jirovecii*. Dez microgramas do DNA amplificado do LBA de uma só amostra (E8) foram utilizados para montar uma biblioteca, sempre comparando com a sequência de *P. carinii* e de outros fungos semelhantes.

Neste nosso estudo a escolha das amostras foi feita de maneira semelhante com preferência pela de maior carga fúngica porém, aqui foram utilizadas várias amostras de acordo com a maior necessidade ao longo do trabalho. As amostras foram selecionadas de acordo com a maior carga fúngica e não foram selecionados grupos específicos de doentes. Foram sendo utilizadas quantidades de amostras conforme as necessidades. Já o sequenciamento foi feito de maneira diferente optando pela amplificação em fragmentos da sequência completa até formá-la por inteiro, com base na sequência descrita no trabalho de Cissé *et al.*, 2012.

O resultado do sequenciamento foi uma sequência com cerca de 5.9Kb e o genoma completo de *P. jirovecii* contém cerca de 8.1Mb. O tamanho da sequência obtida neste estudo se assemelha ao tamanho do β -Glucano de *P. carinii* que tem 6Kb. Esta sequência formada se assemelha em 99% ao contig 236 da sequência publicada de *P. jirovecii* e em 88% à sequência do β -glucano de *P. carinii*. A sequência montada, tal como na sequência completa de *P. jirovecii*, contém baixa percentagem de base GC (35% na sequência formada e 29% na sequência completa de *P. jirovecii*).

A comparação da sequência formada foi feita com base na sequência de *P. jirovecii* contig 236 descrita por Cissé et al., 2012. Pode ser notado que, de modo geral, as sequências *forward* e *reverse* são iguais ao longo das bases com algumas pequenas distinções no início e final de cada sequência devido à dificuldade de sequenciamentos dessas regiões. Na sequência 1 as 11 primeiras bases não foram identificadas pelo *forward* e o *reverse* não as alcança também. Na sequência 2 pode-se notar na sequência *reverse* uma base adenina que não está presente no *forward* e nem na sequência de *P. jirovecii*. Na sequência 3, algumas bases que não haviam sido identificadas no *forward* foram detectadas no *reverse* e são idênticas às bases da sequência de *P. jirovecii*. A sequência 4 encontra-se idêntica em relação ao *forward* e *reverse* e também à sequência de *P. jirovecii*. Na sequência 5 verifica-se uma troca de base constatada tanto no *forward* quanto no *reverse*. A sequência de *P. jirovecii* apresenta uma base adenina e o sequenciamento resultou em uma base guanina na posição 2204. A sequência seis resultou em um alinhamento de *forward* e *reverse* com as mesmas bases em relação à sequência de *P. jirovecii*. A sequência 8 apresenta-se idêntica à de *P. jirovecii*. Na sequência 9 existem no *forward* duas bases alteradas e uma não identificada, mas no sequenciamento do *reverse* essas bases são identificadas e detectadas como idênticas na sequência de *P. jirovecii*. A sequência 12 apresenta-se idêntica à de *P. jirovecii* (Anexo 14).

6. Conclusões

O objetivo deste estudo era, para além de sequenciar a Glucano Sintetase de *P. jirovecii*, encontrar também possíveis polimorfismos que alterem a sequência. Como o micro-organismo ainda não pode ser cultivado *in vitro*, métodos moleculares têm sido descritos para promover avanços na descrição das suas características morfológicas, funcionais e genéticas. Neste estudo foram utilizados métodos de amplificação para identificar a sequência genética do β -Glucano de *P. jirovecii* e estudar possíveis polimorfismos entre suas bases que caracterizem a sequência ou que a alterem significativamente. Estas alterações na sequência podem levar à compreensão de genótipos mais ou menos virulentos e novos conhecimentos acerca de possíveis alvos terapêuticos com consequente resistência a fármacos.

Com o fragmento da sequência da Glucano Sintetase como alvo deste estudo, foi feita sua amplificação por técnicas de PCR conseguindo-se a maior parte da sequência como resultado. Apenas as 14 primeiras bases não conseguiram ser amplificadas, nem com o *primer forward* nem com o *reverse* conseguiram. No entanto, este insucesso não interfere de modo significativo na sequência total do fragmento. Após o sequenciamento do fragmento da Glucano Sintetase em *P. jirovecii* obteve-se uma sequência com algumas bases nucleotídicas que merecem devida importância em relação à sua classificação como polimorfismo de base única (SNP) ou não. Na sequência amplificada designada número 2, a base adenina, localizada na posição 915, está presente apenas na sequência *reverse* não estando presente na sequência *forward* ou na sequência base de *P. jirovecii*. É de questionar se esta base é ou não um potencial SNP. Na sequência de número 5 verificou-se tanto no *forward* quanto no *reverse* a base guanina na posição 2204 ao invés da base adenina. Esta base pode aqui ser considerada como um potencial caso de SNP, devendo-se analisar melhor esta posição em outros estudos para verificar se a base encontra-se mesmo alterada na sequência original do micro-organismo ou se é um caso de polimorfismo e quais as consequências desta alteração com vista na prática clínica como a resistência à terapia ou à resposta imunitária.

Portanto, maiores estudos com outras técnicas moleculares e populações bem definidas com grupos específicos de amostras devem englobar projetos futuros.

SNPs são reconhecidos como marcadores para o estudo de populações, distribuição geográfica, modelos de transmissão e susceptibilidade ou insucesso terapêutico de um genótipo específico. Para além de caracterizar o genótipo do micro-organismo, tem sido proposto que SNPs específicos estão associados com parâmetros precisos da infecção, já que estes polimorfismos contribuem amplamente para a variabilidade genética. (Esteves et al. 2011b; Esteves et al. 2012).

Uma das novas classes de fármacos contra os fungos são as equinocandinas, que têm como alvo a biossíntese do β -Glucano (FKS1-Subunidade da Glucano Sintetase). As equinocandinas funcionam criando enorme estresse na célula, desligando as Glucano Sintetase com conseqüente perda de produção do β -Glucano. Já que a integridade da manutenção da parede celular fúngica é essencial, o organismo não pode sobreviver sem esta estrutura, mesmo quando esta esteja geneticamente alterada de alguma maneira. Tem sido descrito que quando o micro-organismo entra em contato com esta classe de fármacos, a Glucano Sintetase induz mudanças no mecanismo celular que pode levar à variação genética, e estas variações é que estão correlacionadas com a resistência. Para além disso, a FKS1 também é remodelada, de maneira que a susceptibilidade ou resistência às equinocandinas é alterada com essa remodelação. É sugerido que a imobilidade da FKS1 está ligada à estrutura defeituosa da parede celular e perda de função, portanto ela se remodela para sobrevivência do micro-organismo (Utsugi et al. 2002; Perlin 2009).

Para além de melhorar o entendimento em relação aos seus alvos terapêuticos e possíveis resistências relacionadas com a variabilidade genética, o seu sequenciamento representa um aumento nas oportunidades em relação à detecção laboratorial deste micro-organismo. O sequenciamento da região do β -Glucano permite novas abordagens nas detecções sorológicas deste marcador aumentando as metodologias e o alcance diagnóstico dos parâmetros da infecção e rastreio. A melhoria nos recursos de detecção da PPc pode ser conseguida com a implementação de novos testes de diagnóstico mais específicos para a detecção da espécie *jirovecii*.

Uma das importâncias do sequenciamento do gene da Glucano Sintetase de *P. jirovecii* está associada a uma das técnicas coadjuvantes de detecção laboratorial da PPc. O auxílio diagnóstico de marcadores sorológicos tem ajudado na detecção desta infecção. Um

destes marcadores sorológicos é o β -Glucano. Porém sabe-se que outros micro-organismos fúngicos também têm β -Glucano na constituição de sua parede, resultando em testes positivos para este marcador. A sequenciação do gene do β -Glucano de *P. jirovecii* permite o desenvolvimento de uma técnica de quantificação serológica do β -Glucano específico para esta espécie. Sendo assim, deixava de haver dúvidas quanto à origem da espécie causadora da infecção.

Técnicas moleculares aplicadas a amostras biológicas obtidas por métodos não invasivos têm um papel fundamental na detecção precoce de *Pneumocystis* em amostras como o sangue, por exemplo (Tamburrini et al. 1998).

A técnica de amplificação por fragmentos da sequência completa da Glucano Sintetase que se mostra aqui, de modo fácil e específico, pode ter grande utilidade para avaliação de suas bases e possíveis trocas de bases relacionadas com a espécie e com a variabilidade intraintraespecífica. Outros métodos, como o RFLP (do inglês restriction fragment length polymorphism) podem ser utilizados para explorar variações na sequência de DNA.

O presente estudo sequenciou o gene da Glucano Sintetase e mostrou algumas das bases nucleotídicas, como as bases de posição 915 3 2204, como principais candidatas a futuros estudos para correlação entre estas e possíveis lugares de SNPs. Estes polimorfismos podem estar relacionados com possível resistência a fármacos e poderão ser também utilizadas como mais uma ferramenta na identificação laboratorial mais precisa deste micro-organismo através de um marcador sorológico como o β -Glucano.

Apesar de terem sido identificadas potenciais bases polimórficas, estas podem estar sub-representadas, podendo futuramente virem a ser estudadas em um maior número de amostras em populações definidas para avaliar melhor a frequência das ocorrências deste polimorfismo.

A partir daqui, pode-se estudar a importância epidemiológica e clínica de subtipos de *P. jirovecii* e determinar a repercussão que SNPs na sequência do β -glucano podem trazer para a prática clínica ajudando na realização de exames mais precisos e diretos para além de permitir um melhor entendimento de possíveis resistências/insucessos terapêuticos.

Para além do estudo de SNPs, pode-se também a partir da caracterização da sequência da região do β -Glucano de *P. jirovecii*, desenvolver testes sorológicos específicos para a espécie já que, atualmente, os testes são voltados para β -Glucanos incluídos em várias categorias fúngicas. Um teste específico para *P. jirovecii* seria uma abordagem mais rápida, fácil e econômica para a detecção deste micro-organismo.

7. Referências Bibliográficas

- Aliouat-Denis, C.-M. et al., 2008. Pneumocystis species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 8(5), pp.708–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18565802> [Accessed May 29, 2014].
- Aliouat-Denis, C.-M. et al., 2009. The Pneumocystis life cycle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), pp.419–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2822561&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Beck, J.M. & Cushion, M.T., 2009. Pneumocystis workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryotic cell*, 8(4), pp.446–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 30, 2013].
- Brown, G.D. et al., 2002. Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 196(3), pp.407–412. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20020470> [Accessed July 13, 2014].
- Brown, J. et al., 2007. Structure of the fungal β -glucan-binding immune receptor dectin-1 : Implications for function. , 1, pp.1042–1052.
- Chabé, M. et al., 2011. Pneumocystis: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS yeast research*, 11(1), pp.2–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114625> [Accessed September 30, 2013].
- Chan, G.C.-F., Chan, W.K. & Sze, D.M.-Y., 2009. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *Journal of hematology & oncology*, 2, p.25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2704234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 20, 2013].
- Cho, J.-Y. et al., 2009. Newly formed cystic lesions for the development of pneumomediastinum in Pneumocystis jirovecii pneumonia. *BMC infectious diseases*, 9, p.171. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cid, V.J. et al., 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Microbiological reviews*, 59(3), pp.345–86. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239365&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Cissé, O.H., Pagni, M. & Hauser, P.M., 2012. De Novo Assembly of the *Pneumocystis jirovecii* Genome from a Single Bronchoalveolar Lavage Fluid Specimen from a Patient. , 4(1), pp.1–4.
- Costa, J.-M. et al., 2012. Association between circulating DNA, serum (1->3)- β -D-glucan, and pulmonary fungal burden in *Pneumocystis pneumonia*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 55(2), pp.e5–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523258> [Accessed October 6, 2013].
- Costiniuk, C.T. et al., 2011. Discontinuation of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis with CD4 count <200 cells/ μ L and virologic suppression: a systematic review. *PloS one*, 6(12), p.e28570. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3241626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cushion, M. & Keely, S., 2013. Assembly and annotation of *Pneumocystis jirovecii* from the human lung microbiome. *mBio*, 4(1), pp.e00428–12. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531804&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 23, 2013].
- Cushion, M.T. et al., 2007. Transcriptome of *Pneumocystis carinii* during fulminate infection: carbohydrate metabolism and the concept of a compatible parasite. *PloS one*, 2(5), p.e423. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1855432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 30, 2013].
- Cushion, M.T. & Stringer, J.R., 2010. Stealth and opportunism: alternative lifestyles of species in the fungal genus *Pneumocystis*. *Annual review of microbiology*, 64, pp.431–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20528694> [Accessed September 30, 2013].
- Damiani, C. et al., 2011. Serum (1→3)- β -d-Glucan Levels in Primary Infection and Pulmonary Colonization with *Pneumocystis jirovecii*. , pp.2000–2002. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3122691/?report=reader#__ffn_sectitle.
- Desmet, S. et al., 2009. Serum (1-3)-beta-D-glucan as a tool for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection or hematological malignancy. *Journal of clinical microbiology*, 47(12), pp.3871–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2786638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Esteves, F. et al., 2014. (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 : official publication of the*

European Society of Clinical Microbiology, 33(7), pp.1173–80. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24487911> [Accessed September 2, 2014].

Esteves, F. et al., 2011a. Clinical relevance of multiple single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: development of a multiplex PCR-single-base-extension methodology. *Journal of clinical microbiology*, 49(5), pp.1810–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 3, 2014].

Esteves, F. et al., 2011b. Clinical relevance of multiple single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: development of a multiplex PCR-single-base-extension methodology. *Journal of clinical microbiology*, 49(5), pp.1810–5. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3122690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 31, 2014].

Esteves, F. et al., 2010. Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(7), pp.878–84. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719744>.

Esteves, F. et al., 2012. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: a new approach for clinical and epidemiological studies. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(6), pp.E177–84. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487139>.

Esteves, F. et al., 2008. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Journal Compilation _ 2008 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI*, 14, 356–362

Evans, S.E. et al., 2012. Primary alveolar epithelial cell surface membrane microdomain function is required for *Pneumocystis* β -glucan-induced inflammatory responses. *Innate immunity*, 18(5), pp.709–16. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3645441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Gigliotti, F. & Wright, T.W., 2012. *Pneumocystis*: where does it live? *PLoS pathogens*, 8(11), p.e1003025. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3510259&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2013].

Gill, V.J. et al., 1987. Detection of *Pneumocystis carinii* by fluorescent-antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. *Journal of clinical microbiology*, 25(10), pp.1837–40. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=269351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Hauser, P.M. et al., 2010. Comparative genomics suggests that the fungal pathogen pneumocystis is an obligate parasite scavenging amino acids from its host's lungs. *PloS one*, 5(12), p.e15152. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3004796&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2013].
- Hauser, P.M. et al., 1998. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.27–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792058>.
- Held, J. et al., 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 : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(4), pp.595–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20673271>.
- Held, J. & Wagner, D., 2011. β-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(7), pp.1118–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21446990>.
- Helweg-Larsen, J., 2004. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Danish medical bulletin*, 51(3), pp.251–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009058>.
- Huang, L., 2011. Clinical and translational research in pneumocystis and pneumocystis pneumonia. *Parasite (Paris, France)*, 18(1), pp.3–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3671401&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Johnson, M.E. & Edlind, T.D., 2012. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryotic cell*, 11(7), pp.952–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3416503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 4, 2014].
- Karageorgopoulos, D.E. et al., 2011. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(1), pp.39–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22329494>.
- Kelly, M.N., 2013. Current understanding of *Pneumocystis* immunology. , 5(1), pp.43–65. Future Microbiol. 2010 Jan;5(1):43-65. doi: 10.2217/fmb.09.116.

- Kosa, P. et al., 2006. Complete DNA sequences of the mitochondrial genomes of the pathogenic yeasts *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*: insight into the evolution of linear DNA genomes from mitochondrial telomere mutants. *Nucleic acids research*, 34(8), pp.2472–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1459067&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2014].
- Kottom, T.J. & Limper, a H., 2000. Cell wall assembly by *Pneumocystis carinii*. Evidence for a unique gsc-1 subunit mediating beta -1,3-glucan deposition. *The Journal of biological chemistry*, 275(51), pp.40628–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11013231> [Accessed April 29, 2014].
- Latouche, S., Rabodonirina, M. & Mazars, E., 1998. *Pneumocystis*: the “carrier state”: epidemiology and transmission of human pneumocystosis. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.81–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792064>.
- Lipke, P.N. & Ovalle, R., 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, 180(15), pp.3735–40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=107352&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lobo, M.L. et al., 2013. Therapeutic potential of caspofungin combined with trimethoprim-sulfamethoxazole for pneumocystis pneumonia: a pilot study in mice. *PloS one*, 8(8), p.e70619. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3734247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 3, 2014].
- Ma, L. et al., 2013. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(5), pp.1962–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392351> [Accessed September 30, 2013].
- Manners, B.D.J., Masson, A.J. & Patterson, J.C., 1973. The Structure of a P- (1- * 3) -D-Glucan from Yeast Cell Walls. , pp.19–30.
- Matos, O. et al., 2006. Infecção por *Pneumocystis jirovecii*. *Acta Med Port* 2006; 19: 121-126
- Matos, O., 2012. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Africa: Impact and Implications of Highly Sensitive Diagnostic Technologies. *North American journal of medical sciences*, 4(10), pp.486–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3482781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Matsumura, Y. et al., 2012. Quantitative real-time PCR and the (1→3)-β-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(6), pp.591–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21973089>.
- Menotti, J. et al., 2013. Evidence of airborne excretion of *Pneumocystis carinii* during infection in immunocompetent rats. Lung involvement and antibody response. *PLoS one*, 8(4), p.e62155. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3633925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2013].
- Morris, A. & Norris, K. a, 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), pp.297–317. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 30, 2013].
- Nakamura, Y., 1998. The major surface antigen of *Pneumocystis carinii*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.67–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792062>.
- Olson, E.J. et al., 1996. Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infection and immunity*, 64(9), pp.3548–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174262&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Olsson, M. et al., 1993. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, 34(8), p.2052. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=229188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Perlin, D.S., 2009. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. , *Drug Resist Updat.* 2007 Jun;10(3):121-30. Epub 2007 Jun 13
- Prévost, M.C. et al., 1998. Pneumocystosis pathophysiology. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.123–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792071>.
- Punta, M. et al., 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), pp.D290–301. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245129&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 9, 2014].

- Rivero, L. et al., 2008. Pneumocystis jirovecii Transmission from Immunocompetent Carriers to Infant. *Emerging Infectious Diseases*, 14, pp.1116–1118. Available at: <http://www.cdc.gov/eid/content/14/7/1116.htm>.
- Rycovska, a., 2004. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*, 150(5), pp.1571–1580. Available at: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.26988-0> [Accessed May 29, 2014].
- Sax, P.E. et al., 2011. Blood (1->3)-beta-D-glucan as a diagnostic test for HIV-related Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(2), pp.197–202. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3165964&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 6, 2013].
- Sendid, B. et al., 2013. Strategy for overcoming serum interferences in detection of serum (1,3)-β-D-glucans. *Journal of clinical microbiology*, 51(1), pp.375–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3536258&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shapiro, J. et al., 2004. Interaction Network and Altered Sensitivity to Caspofungin. , 49(May), pp.35–49.
- De Souza, W. & Benchimol, M., 2005. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8), pp.903–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16444423>.
- Stringer, J.R. et al., 2002. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging infectious diseases*, 8(9), pp.891–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732539&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Stringer, J.R., 1996. *Pneumocystis carinii* : What Is It , Exactly ? , *Clin Microbiol Rev.* 1996 Oct;9(4):489-98.
- Stringer, J.R. & Cushion, M.T., 1998. The genome of *Pneumocystis carinii*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.15–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934582>.
- Su, T.H. & Martin, W.J., 1994. Pathogenesis and host response in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Annual review of medicine*, 45(1), pp.261–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198382>.
- Tamburrini, E. et al., 1998. Potential impact of *Pneumocystis* genetic diversity on the molecular detection of the parasite in human host. *FEMS immunology and medical*

microbiology, 22(1-2), pp.37–49. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792059>.

Teramoto, S. et al., 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), pp.393–4. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755639>.

Utsugi, T. et al., 2002. Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(1), pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856368>.

Vogel, M.N. et al., 2011. Accuracy of serum LDH elevation for the diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Swiss medical weekly*, 141(April), p.w13184. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21528464> [Accessed October 6, 2013].

Wakefield, a E., 1998a. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.59–65. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792061>.

Wakefield, a E., 1998b. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS immunology and medical microbiology*, 22(1-2), pp.5–13. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792056>.

Walzer, P.D., 1999. Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 6(2), pp.149–55. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Wang, J., Wright, T.W. & Gigliotti, F., 2011. Immune Modulation as Adjunctive Therapy for *Pneumocystis pneumonia*. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2011, p.918038. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3166570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2013].

Wang, J.J.-Y., Bensmail, H. & Gao, X., 2012. Multiple graph regularized protein domain ranking. *BMC bioinformatics*, 13, p.307. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3583823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Watanabe, T. et al., 2009. Serum (1-->3) beta-D-glucan as a noninvasive adjunct marker for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in patients with AIDS. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(7), pp.1128–31. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19725788> [Accessed October 6, 2013].

Yasuoka, a et al., 1996. (1->3) beta-D-glucan as a quantitative serological marker for Pneumocystis carinii pneumonia. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 3(2), pp.197-9. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=170276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

8. Anexos

Anexo 1

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
PeariniiGlucan	ATGTCACACACACAGCATTATTACGATGATTCGATGGAGGGCAGAAATGGAGGGTATTATGGGAGCATAGTTATGATATACGGGGTTAATATGGTCTTATGGATCGGGAGTGTATGA---GCAGG													
Purina	ATGTCACACACACAGCATTATTACGATGATTCGATGGAGGGCAGAAATGGAGGGTATTATGGGAGCATAGTTATGATATACGGGGTTAATATGGTCTTATGGATCGGGAGTGTATGA---GCAGG													
Iphaffii														
Ncastellii														
Ndairensis														
Iphaffii2														
Dhanseni														
Sstipitii														
Consensus													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
PeariniiGlucan	GGGGTATTATGGACCGAATATGGACAGAAATATTATGATGATGATGATGGAGGGGGTCTATGATATGGACAGGGCATGATGATATATGATGGGGAGGAAATATTATGTCAGGAGGAGGG													
Purina	GGGAAATATTATGGACCGAATATGGACAGAAATATTATGATGATGATGATGGAGGGGGTCTATGATATGGACAGGGCATGATGATATATGATGGGGAGGAAATATTATGTCAGGAGGAGGG													
Iphaffii														
Ncastellii														
Ndairensis														
Iphaffii2														
Dhanseni														
Sstipitii														
Consensus													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
PeariniiGlucan	GTATTGATTTATCTCAGATG-GATATGTTGGAGATACGTATGGTATAAAAAAGATATTITGGAGGGTAA-----TGGATATTCARAGGACAGATGATATATACGATATGATCGTARAGG													
Purina	GTATTGATTTATCTCAGATG-CGATATATGGAGATACATATGATCCTTACGGGTTCCTATGGCGGATCAGCGTCCCTTCAGATATTCARAGGACAGATGATATATGATCGTARAGG													
Iphaffii														
Ncastellii														
Ndairensis														
Iphaffii2														
Dhanseni														
Sstipitii														
Consensus													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
PeariniiGlucan	AAGCGTAGAGGGTATCGAGGGCATCGGAGACGTT--TTCGGATTTACGATGCGATCGGACATGGTTGAGCGGGGAAATATGATTCGATGGACGATTCGACGAGCGATATCGGTCGATGAGCCTA													
Purina	AAGCGTAGAGGGTATCGCAGAGGGATCAGAACCGTT--TTCGATTTACGATGCGATCGGATGGTTCGTCGAGCTGAAATTTGATTCATATGGTCGATTCGATGACGATATCGATCGATGGACCTA													
Iphaffii														
Ncastellii														
Ndairensis														
Iphaffii2														
Dhanseni														
Sstipitii														
Consensus													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
PeariniiGlucan	GTACGGAACTGTAATCAATGGCATCCGACACAGTGGATATCGTC-CGGATTCCTCAAAATATCGTATCGGGAAATCGATCCGGAGCAGATACGCCAATTTACGGATGACT--ATAATCAG													
Purina	GTACGGAACTTTGATCAATGGCATCCGACACAGTGGATATCGTC-CGGATTCCTCAAAATATCGTATCGGGAAATCGATCCGGAGCAGATACGCCAATTTACGGATGACT--ATAATCAG													
Iphaffii														
Ncastellii														
Ndairensis														
Iphaffii2														
Dhanseni														
Sstipitii														
Consensus													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
PeariniiGlucan	CGGCTATGATGACCTCAGCGAGATCTCGTGGCCTTACCCACATGGACCGGAAATCAATACCCATTTCTAAGAGAAATAGAGGATATATTTATCGATCTACGATATAAATTTGGGTTCCAAAG													
Purina	CGGCTATGATGACCTCAGCGAGATCTCGTGGCCTTACCCACATGGACCGGAAATCAATACCCATTTCTAAGAGAAATAGAGGATATATTTATCGATCTACGATATAAATTTGGGTTCCAAAG													
Iphaffii														
Ncastellii														
Ndairensis														
Iphaffii2														
Dhanseni														
Sstipitii														
Consensus													

2341 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470
 PcariniiGlucan
 Purina CACGATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTGGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Tphaffii TACATATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Ncastellii TACCATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Ndairenensis TACCATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Tphaffii2 TACCATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Dhanseii TACCATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Sstipitis TACCATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT
 Consensus TACCATTTATGGTATATCAITGGGAATCACTATTGTCAGTCGCTAGGTCATTTATTTAGGAGTTCTATATGGACACTTGGCGGAATATATTCTCAGAAATGCCGAARAGGATTTATCTAAGATT

2471 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
 PcariniiGlucan
 Purina CTGGCTACAAATGATATGGGAATAAATATAACTAAGTCTTATTTACACAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Tphaffii TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Ncastellii TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Ndairenensis TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Tphaffii2 TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Dhanseii TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Sstipitis TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC
 Consensus TGGCCACTACTGACATGGAAATCAAGTATAGCCAAAGGTTTAAATTTCTCAGTTGGGAATGCCGTTGTATATCGATGATATCGTGAACTCTCTTGCATTGATCATGTTCAAAGTATTATATC

2601 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730
 PcariniiGlucan
 Purina ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Tphaffii ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Ncastellii ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Ndairenensis ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Tphaffii2 ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Dhanseii ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Sstipitis ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Consensus ATCAGGTTCTCTGACACAGAGGGGAARAGGACCTTAGGGCCGCCAATTTTCATATCACAGAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG

2731 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860
 PcariniiGlucan
 Purina TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTCTACTCCGATTCCTGACCCCTTCTGTCGATATATGCTACGTTTACCGTCTCTGTTCTCTCATATGGGAARAGATTTATACCTTTTAGGGGAT
 Tphaffii TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTCTACTCCGATTCCTGACCCCTTCTGTCGATATATGCTACGTTTACCGTCTCTGTTCTCTCATATGGGAARAGATTTATACCTTTTAGGGGAT
 Ncastellii TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTCTACTCCGATTCCTGACCCCTTCTGTCGATATATGCTACGTTTACCGTCTCTGTTCTCTCATATGGGAARAGATTTATACCTTTTAGGGGAT
 Ndairenensis TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTGACARTCCGATTAAGGACCTTTACCAATTTGATACACAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Tphaffii2 TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTGACARTCCGATTAAGGACCTTTACCAATTTGATACACAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Dhanseii TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTGACARTCCGATTAAGGACCTTTACCAATTTGATACACAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Sstipitis TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTGACARTCCGATTAAGGACCTTTACCAATTTGATACACAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG
 Consensus TCGATTTCCATTTTTCGCTCAATCTCTTTGACARTCCGATTAAGGACCTTTACCAATTTGATACACAGGATCATTC-----TTTAAACG-----GAGTTTTTCTTCACATAGTGAGCAGAACG

2861 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990
 PcariniiGlucan
 Purina ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Tphaffii ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Ncastellii ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Ndairenensis ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Tphaffii2 ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Dhanseii ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Sstipitis ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG
 Consensus ATTCGTGAGGATGATCAATATCAGAGTACACTACTAGATATCTTAARCAATTCGATCCTGTAGATGGGATGTTTGTARGGATACCAAGATATTAGCCGAGAGACTTCACTTTATATGGAG

2991 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 PcariniiGlucan
 Purina GAGTCCCTT-----TTGATAAAGATGAAAGGATACCGTGAARAGCAGATCGATGATTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Tphaffii GAGTCCCTT-----TTGATAAAGATGAAAGGATACCGTGAARAGCAGATCGATGATTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Ncastellii ACAGGGA-----GAAACTGATAAAGATGATGCGATGAAATCGAATTTGATGATTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Ndairenensis ACAGGGA-----GAAACTGATAAAGATGATGCGATGAAATCGAATTTGATGATTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Tphaffii2 ATGATGATATGGGAATGAAAGGACATATTAAGATGAGGCAATGATACAGCTGTTGATGATTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Dhanseii GCAGATGAT-----CAAGAGGTTATCTGAGATGATGATGAGTCAAAATTTGACGACTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Sstipitis GGGATGAT-----CTGAGAGTTGCTGAAATGGTTGAGTCAAAATTTGACGACTTACCTTTTATTTGTTGGATTTAAATCTTCTGCGCCAGAGTATACATTAAGGACACTATTGGGC
 Consensus a.GatGa.....aGa,aa..t.taagAgAtg...tgaAtc...aaTgAtGAtTAcCaTtTATTGTAATGGTTCaAAtCtGTCGtCC.GaATAcTcTAcGAc.cGtATcTGGGC

3121 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250

PeariniiGlucan
Purina ATCATACGTTCTCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Tphaffii ATCATACGTTCTCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Ncastellii TTCTTAGAGTCCCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Ndairenensis TTCTTAGAGTCCCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Tphaffii2 TTCTTAGAGTCCCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Dhanseni ATCTTTGAGTCTCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Sstipitis ATCTTTGAGTCTCAACCTTTATACAGACTGTTCTGGATTATGAAATATTACGTCGCTATTAAAGCTCTTTATCGTGTGAAATCTGATGTTGTCAAAATGTCGGTGGAAATCTGATTAATG
Consensus TCCTTaaGATC,CAACATaTaaGACTG,TCGGctT,ATGATtAcT,caaaGct,ATtAatTatT,TAaccGtTgAAATCCaGaa,TAgtTCAaagTtTtGG,gbtAc,c,GAaggtT.

3251 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380

PeariniiGlucan
Purina GACATGATAGAAAGGATGGCACGTAGGAAATTCARATTTGACATATCAATGCACGGTCTTCAAAATTTAGTAAGAGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Tphaffii GACATGATAGAAAGGATGGCACGTAGGAAATTCARATTTGACATATCAATGCACGGTCTTCAAAATTTAGTAAGAGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Ncastellii GAAAGAGGATAGAAAGGATGCACAGAGAAATTCARATTTTGGTTTCATGCACAGATGGCTAAATTCARACCTATGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Ndairenensis GAAAGAGGATAGAAAGGATGCACAGAGAAATTCARATTTTGGTTTCATGCACAGATGGCTAAATTCARACCTATGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Tphaffii2 GAAAGAGGATAGAAAGGATGCACAGAGAAATTCARATTTTGGTTTCATGCACAGATGGCTAAATTCARACCTATGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Dhanseni GAAATGATAGAAAGGATGGCTAGAGAAATTCAGATTTAGCTCCATGCACAGATGACTAAATTCARACCTATGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Sstipitis GAAATGATAGAAAGGATGGCTAGAGAAATTCAGATTTAGCTCCATGCACAGATGGCTAAATTCARACCTATGAAATGGAAATACGGAAATTTCTTCCTCGTCTTACGATCTCARR
Consensus Gaa,aaGaaTtGAAAGATG,C.,aaGaaAGGTTcAaaTtctt.,gTc,ATGCAaaGatTagcAaaTtAaacc.cbtGaatTgGaaATGcGtGaatTtTgTaaGaaGctTcCaGatTcAaa

3381 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510

PeariniiGlucan
Purina TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Tphaffii TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Ncastellii TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Ndairenensis TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Tphaffii2 TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Dhanseni TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Sstipitis TTGCATATTTGGATGAGAGCCTCCGATGACGAGGAGGATGAACCGAAATATACCTCTTCTGATCGATGGTATTTCGAAATATGAGAAATGGTAAACCGCAGCCAAAGTTTAAATTCATTTATC
Consensus TtGcTAcTtTgGAtGaaGaaCctCt,cTgaa,GAagGtGAtGAACCaGaaT,TAcTtGctTtAaT,GAcGctcAtTgGaaTt,TAaAAATGGtGt,aaGctCctAaaTtTAgGtTcAaTtATC

3511 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640

PeariniiGlucan
Purina TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Tphaffii TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Ncastellii TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Ndairenensis TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Tphaffii2 TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Dhanseni TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Sstipitis TGGTAACTTCTTGGCGATGGTAAAGTGATATCAGAAATCATGCAATCATATTTATCGCGGTGATACATTCAGCTTATGATGCTAATCAAGATATATCTGAGAGATGCTTAAATTCG
Consensus TGGTAACTcAtTtTaaGctGAtGGTAAAtcTGATATcAaaTcAtGctTt,ATtTctAaaGaaGtGaaTcAtcCAaTt,ATtGAtGcAAtcAaaGaaAAtTtTcTaaGaaTgTtTgAAgAtTaaG

3641 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770

PeariniiGlucan
Purina TCGGTTTATGCGAATTTGAAGAAATGACTCCTACAGAGAGGATCCCGTATATCC--AAATGAATTCAGGT-----GCTACTAAT----CAAGTGGCTATTTAGGCGCTCAGAGATACATTTTTT
Tphaffii TCGGTTTATGCGAATTTGAAGAAATGACTCCTACAGAGAGGATCCCGTATATCC--AAATGAATTCAGGT-----GCTACTAAT----CAAGTGGCTATTTAGGCGCTCAGAGATACATTTTTT
Ncastellii TCGTATCTTGTGAAATTCGAGAAATAGATGCTGACCAATTCARCTTATGCGCCAGGTTTAAATACAGAT--CAAGTAGCAACAT--CTGTGTCTATGTTAGGCTAGAGATACATTTTTT
Ndairenensis TCGTATCTTGTGAAATTCGAGAAATAGATGCTGACCAATTCARCTTATGCGCCAGGTTTAAATACAGAT--CAAGTAGCAACAT--CAAGTGGCTATTTAGGCGCTCAGAGATACATTTTTT
Tphaffii2 TCGTATCTTGTGAAATTCGAGAAATAGATGCTGACCAATTCARCTTATGCGCCAGGTTTAAATACAGAT--CAAGTAGCAACAT--CAAGTGGCTATTTAGGCGCTCAGAGATACATTTTTT
Dhanseni TCGTATCTTGTGAAATTCGAGAAATAGATGCTGACCAATTCARCTTATGCGCCAGGTTTAAATACAGAT--CAAGTAGCAACAT--CAAGTGGCTATTTAGGCGCTCAGAGATACATTTTTT
Sstipitis TCGTATCTTGTGAAATTCGAGAAATAGATGCTGACCAATTCARCTTATGCGCCAGGTTTAAATACAGAT--CAAGTAGCAACAT--CAAGTGGCTATTTAGGCGCTCAGAGATACATTTTTT
Consensus TcTgTtTAgCtGaaTtTcGAAgAtT.,atg.,gaacaagt,aa,CCaTaa.,CC,gg.,TgAa,tatgaagaa.,caagtAac,AA,ca.,CC,GT,GctATgT,GGtGctAaaGaaTatATTTTcT

3771 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900

PeariniiGlucan
Purina CAGAAATATAGGTGTTTGGGTGACGTAGCTGCAGGGAAGAACAACTTTGGACATTTGTTGCACGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Tphaffii CAGAAATATAGGTGTTTGGGTGACGTAGCTGCAGGGAAGAACAACTTTGGACATTTGTTGCACGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Ncastellii CAGAAATCTGGTGTCTTGGTGTATGCTGCTGGTAAAGAACAACTTTGGTACATTTATGCTGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Ndairenensis CAGAAATCTGGTGTCTTGGTGTATGCTGCTGGTAAAGAACAACTTTGGTACATTTATGCTGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Tphaffii2 CAGAAATCTGGTGTCTTGGTGTATGCTGCTGGTAAAGAACAACTTTGGTACATTTATGCTGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Dhanseni CAGAAATCTGGTGTCTTGGTGTATGCTGCTGGTAAAGAACAACTTTGGTACATTTATGCTGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Sstipitis CAGAAATCTGGTGTCTTGGTGTATGCTGCTGGTAAAGAACAACTTTGGTACATTTATGCTGACTTATGCAAGATCGGCGAAGCCTCATATGGTCACTCCTGATTTCTTGAATGGTCC
Consensus C,GAaAAtcctGGTGTtTaaGtGAtGtGctGctGGtAaaGaaCAAcTtTGGtAcAtTtTtGc,cGtAcTtTAgC,CAaTtGGtGGtAAAtTcATTATGGTCACTCCGATTTc,T,AAAGctAc

5461 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590

PcariniiGlucan
Pnurina GTATAGTAAATTTAGGTTTATGCTATGCTCAACCTGCCCCGAGAAATTTGTTGCAAAAGTTATAGAGTTATCTCTTTTGGCTGCCGATTTTGTCTGGACATTTGTGTATTTATCTACACCT
Iphaffii GTATAGTAAATTTAGGTTTATGCTATGCTCAACCTGCCCCGAGAAATTTGTTGCAAAAGTTATAGAGTTATCTCTTTTGGCTGCCGATTTTGTCTGGACATTTGTGTATTTATCTACACCT
Ncastellii GTACGGTCCGGTATGGGTACAGTGTGGACTCAACCTTCTAGAGAAATATGCTGCTAGGTCATGAAATGTCGGAAATTTGGCTGCTGATTCGTTTGGCCACATCTCTATCTGTCAAGCTCCA
Ndairenensis GAACAGTA----ATGGGTATG----ATTGGACTCAACCAACAGAGAGTTCCTGGCTAAGGTTATGAAATGCTGAAATTTGGCTGCCGATTCGCTGAGGCACATCTCTATCTGTCAAGCTCCA
Iphaffii2 GACCCACGAGGTTACGGTCTTTATCGTGGCCGACACATTTAGAGAAATACATTTGCCAAAGGATGAAATGCTGAAATTTGCAAGCTGATTTATTTTAGGTCATACGTTAAATTTGTCAATTACCA
Dhanseni GTATGTTCTGGTTAGGTTACATGACCTGGACTCAACCTGCTGCTGAAATCTGAAATGTCGGAAATTTGGCTGCTGATTCGTTTGGCCACATCTCTATCTGTCAAGCTCCA
Sstipitis ATCCGCTACTGGTATGGCTGGATGGACTCAACCTGCTGCTGAAATCTGAAATGTCGGAAATTTGGCTGCTGATTCGTTTGGCCACATCTCTATCTGTCAAGCTCCA
Consensus Gtacagtac.ggtatggtt.....gcttggactcaacca.ctaGaaGAtc.t.tgct.AAggt.aTcGaaTgTctgaaTTTGTcGc.GAtTtGcttT.GctCAat.aT.t.TatTctgtCAatTcaCca

5591 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720

PcariniiGlucan
Pnurina ATATGGCCATACCTTATATGATCGTGGCATCTATGCTCTATTTGGCTTCGACCTTCTCGCAAAATCGACCACTATATTTTCATGAAACAAATAGCTTCGAAARAGGATTTGTCGTCGAT
Iphaffii ATATGGCCATACCTTATATGATCGTGGCATCTATGCTCTATTTGGCTTCGACCTTCTCGCAAAATCGACCACTATATTTTCATGAAACAAATAGCTTCGAAARAGGATTTGTCGTCGAT
Ncastellii TTATATATATCCCGATATGATGATGTTTCATTCATGATGTTCTGGTAAACCGCTCTCGTCAAAATCGTCCACATCTATTCATTAAGCCAGCTAGGTTACATAGCCGATGGTCAAAAGT
Ndairenensis GTATTTGATATCCACCAATGATAAATACACTCTATCATGTTGTTTGGTAAAGACTTCTCGTCAAAATCGTCCACATTTTCCTTTTGAACCAACTCGTCTGCTAGCCGATGATGATGAAAT
Iphaffii2 ATCTATGATATCCCAAAATGATAAATACACTCTATCATGTTGTTTGGTAAAGACTTCTCGTCAAAATCGTCCACATTTTCCTTTTGAACCAACTCGTCTGCTAGCCGATGATGATGAAAT
Dhanseni ATCTATGATATCCCAAAATGATAAATACACTCTATCATGTTGTTTGGTAAAGACTTCTCGTCAAAATCGTCCACATTTTCCTTTTGAACCAACTCGTCTGCTAGCCGATGATGATGAAAT
Sstipitis ATTTTGTATCCCATTAATGATAGATGGCATCTACATGTTGTTGCTGGTAAACCGCTCGAGGTTGATGAACTCCCAATTTATGATTCAGCTCAATCTACTCTTTGAAACAGCAGATGGAAGAGGATGGTCAAGAAAT
Consensus aTtT.t.gTAtTcCcat..aTcGATagattgcatTcTcAt..atgt.TaTtTgGt.T.aaaCct.TcTcGtcaAAATcGcCcaCaRTatTatTcTtTgAAgCAAgct.ag.tT.cGaaAaac.ATggTta.aaaaT

5721 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850

PcariniiGlucan
Pnurina ATGCACCTTTGCTTTGGTCTTTTTTACITTTTTCTTATGATATCCCTGTTCCAGCACTAGGG----CATTCTAAATTTCCAAATCTCTTAAATATATGCTTTTCTTAAAACTTGGGACTTAT
Iphaffii ATGCACCTTTGCTTTGGTCTTTTTTACITTTTTCTTATGATATCCCTGTTCCAGCACTAGGG----CATTCTAAATTTCCGAAATCTCTTAAATATATGCTTTTCTTAAAACTTGGGACTTAT
Ncastellii ACATCTGATATTTGTTGGTCTTTTTAGTGTATTTCTAGTGTATCATCTGCACTGATGCA----TCATATACGTTGGCGATGATGCTAGTCTTTAACTGGTGGCTTCCATGAT
Ndairenensis ATTCATGATATACATCTCATTTTGTATGCTTTGCTGGTGTATCATGCTGCTGCTGATGCT----GGTCTCGTGTCCATAGAGATTTGGTACTCTTACGCTGGTATCACCAATATTTATTC
Iphaffii2 ATGTTTCTTATACATGGTGTTTTTGTTCTATTTGCAAGGTTGATATTTGGACCACTGTTGCA----GGATCTCGTGTCCATAGAGATTTAGGTACTACTACTACAGGAGCCGACATATTTGTTTC
Dhanseni ACATGCTATTTCTTTATGTTTATGCTTTTGGTGGCTTTTGGTGGCTGATATGTTGGACCACTGTTGCA----TCAGCTCATGTTCCAAAGACATTTGGCAGCGATTTACGCGCCATGGAARACTTAGTA
Sstipitis ACTGTTCTTTATATTTGCTGATTTGATTTTGGTGTATTTGTTGTTATTTGATAGTTGGCCAGCTGTTGCT--TCGGAGCAATAGATAATATTGAGCCTTCTGGGTTGCAAGGATGGTCTTTCAAGGTTTGTTC
Consensus Act..tc.tTaTact.TggtgTtTt..t.t..TtTgTgTt.t.TATcatt.GtCcaGcTgTgC.....g.a.ct...gtt...aa.gat.ttg.ta.t...c.actggt.c...c.a.aaat.t.ttc

5851 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980

PcariniiGlucan
Pnurina CAACTTCTAATGATCCAGGGGCGCAACCGGTAGAACCA-----CAGACCAAGGAAATCTAATGAACTTAAATGTTTATATACT--GA
Iphaffii CAGCCTTCTAATGATCCAGGGGCGCAACCGGTAGAACCA-----CAGACCAAGGAAATCTAATGAACTTAAATGTTTATATACT--GACGATTATC
Ncastellii CAGCCAGGAAATGATCCGATATGACACTGGTTACCAATGTCCGA-----CATACTGAGCCATTATTA--CACACACACCACTCTTAGAGACCTGGTCTACCAT
Ndairenensis CAAACAGGACATGTTAACAATATGATACAGGACTGGAAATGCCA-----CATACTAGGCAATTATTA--CACGATTACTCTTCAATGAGACGTTGGTCTACTTAG
Iphaffii2 CAGTCAGGAAATGATGATATATGATACAGGACTGGAAATGCCA-----CATACTAGGCAATTATTA--TACCAATACCACTCTCTAGAGCATGGGCACTATAC
Dhanseni CAAACAGGACATGTTAACAATATGATACAGGACTGGAAATGCCA-----CATACTAGGCAATTATTA--TACCAATACCACTCTCTAGAGCATGGGCACTATAC
Sstipitis CAAACAGGAAATGATGACACCAATGACACAGGTCARACAGGCAAAACATTAACACTTGGCCAGCATATTTGTCARAGAGTCAAGGCACTCAATTAACCACTAAGGCCTTTAGATCATCCAC
Consensus CAacCaagaaAtggt..a.AataaatGat.ACaGGt..a..aat..cga.....c.tac..aggtcAtTatta..aac.tAcaccat.t.ta..ac.tggtcTacta..

5981 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110

PcariniiGlucan
Pnurina AAAA
Iphaffii AAATAG
Ncastellii AATTA
Ndairenensis AACTGA
Iphaffii2 ACATTA
Dhanseni TCAACTAAAGCTTA
Sstipitis AAATGGAAAGTCAATCATTTGGTGTATTAATGACCGATTACTGCTACATATTTTCAACCAATTAATGAGTGTGATTTATACACTTTTATATACTTTTGTTTACATTTGAATTCAGGTTTAT
Consensus aaat.....

6111-117
-----|

PcariniiGlucan
Pnurina
Iphaffii
Ncastellii
Ndairenensis
Iphaffii2
Dhanseni
Sstipitis
Consensus TTACGAT
.....

	2301	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390	2400
p. carinii	CCATATCAAGCCAAATCACTCTGGAAATAAATGATATCACTGATCTGGTATTATCTTTTGAACAGATATTGTGGTATATCATTGGAACTACTATT										
p. jirovecii	CCATATCAAGCCAAATCACTCTGGAAATAAATGATATCACTGATCTGGTATTATCTTTTGGATACATATTATGGTATATTTTGGAACTACTATT										
Consensus	CCATATCAAGCCAAATCACTCTGGAAATAAATGATATCACTGATCTGGTATTATCTTTTGAACAGATATTGTGGTATATCATTGGAACTACTATT										
	2401	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490	2500
p. carinii	GTTCAAGTCGCTAGGTCATTTTATTTGGGAGTTTCTATATGGACACCTTGGAGAAATATATTCTCAGAGATGCCGAAAGGATTTTCTAAGATTCTGGC										
p. jirovecii	GTTCTGTTGCTAGATCGTTTTATCTGGGAGTTTCTATATGGACACCTTGGAGAAATATATTCTCAGAGATGCCGAAAGGATTTTCTAAGATTCTGGC										
Consensus	GTTCAAGTCGCTAGGTCATTTTATTTGGGAGTTTCTATATGGACACCTTGGAGAAATATATTCTCAGAGATGCCGAAAGGATTTTCTAAGATTCTGGC										
	2501	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570	2580	2590	2600
p. carinii	TACAATGATATGGAAATAAAATATAACCTAAAGTCTTATTTCCACAGTTTGGAAATGCCATTGTTATATCGATGATCGTGACATC--TTCTT-GCA										
p. jirovecii	ACAATGATATGGAAATAAAATATAACCTAAAGTCTTATTTCCACAGTTTGGAAATGCCATTGTTATATCGATGATCGTGACATC--TTCTT-GCA										
Consensus	ACAATGATATGGAAATAAAATATAACCTAAAGTCTTATTTCCACAGTTTGGAAATGCCATTGTTATATCGATGATCGTGACATC..TTCTT.GCa										
	2601	2610	2620	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
p. carinii	ATT-GATCATGTTC-AAAAGTTATATATCATCAGGTATGATGATCTTAGTATTATCATTGGGGGAGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTCCITTTATCCT										
p. jirovecii	ATTGATCATGTACAAAAATTACATATATCACCAGGTATGATGATCTTAGTATTATCATTGGGGGAGAGGGTTTTTTTTTTTTTTTCCITTTATCCT										
Consensus	ATT.GATCATGTaC.AAAAaTTAcATATATCaCAGGTAT.....Tact										
	2701	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770	2780	2790	2800
p. carinii	AATAATTCGCTAGGTTCTTCTGACAGAGGGAAAGAGACGTTAAGGGCCCAACATTTTTCATATCGCAGAGGATCATTCTTTAAACGGAAATTT										
p. jirovecii	AATAATTTATAGGTTCTTCTGACAGAGGGAAAGAGACGTTAAGGGCCCAACATTTTTCATATCGCAGAGGATCATTCTTTAAACGGAAATTT										
Consensus	AATAaaTcaTAGGTTCTTCTGACAGAGGGAAAGAGACGTTAAGaGCaCCAACATTTTTCATATCaCAGAGaGATCATTCTTTAAACCGAAATTT										
	2801	2810	2820	2830	2840	2850	2860	2870	2880	2890	2900
p. carinii	TTCTTCCATAGTGAGCAGAACGTCGATTTCTTTTCTGCTCAATCTTTCTACTCCGATTCTTGAACCCCTTCTGTGATATATGCTTACGTT										
p. jirovecii	TTCTTCCATAGTGAGCAGAACGTCGATTTCTTTTCTGCTCAATCTTTCTACTCCGATTCTTGAACCCCTTCTGTGATATATGCTTACGTT										
Consensus	TTCTTCCATAGcGaGcAGAACGTCGATTTCTTTTcGCTCAATCaCTTTCTACcCaATTCCaGAAcCTTCCaGTcGATATATGCTTACGTT										
	2901	2910	2920	2930	2940	2950	2960	2970	2980	2990	3000
p. carinii	TACCGTCTTGTTCATTATGGAGAAAGATTTTATCTCTTAAAGGAGATTATTCGTGAGGATGATCAATTAACAGAGTACATTGCTGGATAT										
p. jirovecii	TACCGTCTTGTTCATTATGGAGAAAGATTTTATCTCTTAAAGGAGATTATTCGTGAGGATGATCAATTAACAGAGTACATTGCTGGATAT										
Consensus	TACcGTTCTTGTTCcCATTATGGaGAAAGATTTTATcCTCTTaaGAGaATTATaCGTGAaGATGATCAATaTcAGAGTAcAcTAcTaGATAT										
	3001	3010	3020	3030	3040	3050	3060	3070	3080	3090	3100
p. carinii	CTTAARCAATTGCATCTGTAGATGGGATTGTTTTGTTAAGGATACCAAGATATTAGCCGAGGAGACTTCACTTTATATGGAGGATCTTTTGGATA										
p. jirovecii	CTTAARCAATTGCATCTGTAGATGGGATTGTTTTGTTAAGGATACCAAGATATTAGCCGAGGAGACTTCTCTTTATATGGAGGATCTTTTGGATA										
Consensus	CTTAARCAATTGCATCTGTAGATGGGATTGcTTTGTcAAGGATACCAaAATATTAGcAGAGaGAACTTCTCTTTATATGGAGGAGcAcCTTTTGGATA										

	4501	4510	4520	4530	4540	4550	4560	4570	4580	4590	4600
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	ATTGACTGAAGAGGGTGTATGGAGGGCTTACACGGCTTGGCAAAACATTTGGTTCCTTATCTCCTTTATTCGAAGTGTGGTTCTCAAACTATGCT										
Consensus	aTTaACTGAAGAGGGTGTATGGAGGGcTcTAcAcGcCTTGGcAAACATTTGGTTCaTATATcGCTTTATTCGAAGTGTGGTTCTCAAACTATGCTc										
	4601	4610	4620	4630	4640	4650	4660	4670	4680	4690	4700
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	AATTCCTTGCCTCAAAATCTTGCATTGGTGGTGCCTGATATATGGAACTGGTGGTGGATTGGCACTACTAGAAATCCATTTCAATTCCTTTTCAA										
Consensus	AATTCCTTAcCTCAAAATCTTGCATTGGaGGTGCCTGATATATGGAACTGGTGGTGGATTGGCaACTACTAGAAATCCATTTCAATTCCTTTTCAA										
	4701	4710	4720	4730	4740	4750	4760	4770	4780	4790	4800
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	GATTTGCTGGCGCATCTATATACCTGGGTTCTGACCTTATTATGCTTTATTGCGACGGTACAAATGGGATACCTCATTAGTACTCTTTGGGT										
Consensus	GaTTTGGCTGGcGCATCTATATAcTTGGGTTcAcGcAcCTTATTATGCTcTTATTGCaAcGGTAcAAATGGGATAcCTCATTAGTAcTCTTTGGGT										
	4801	4810	4820	4830	4840	4850	4860	4870	4880	4890	4900
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TTCAGATTGGCCCTTTGTATATCTCCATTATCTTAACTCCACATCAATTTTCATGGACAGATTTTCCTGGATTATAGGGAAATCACTCGTGGTATA										
Consensus	TTCAGaTTAGCaCTTTGTATATccCCATTATCTTAACTCCAcCAATTTTCATGGAcAGATTTTCCTGGATTATAGaAAATTCaCTCGTGGTATA										
	4901	4910	4920	4930	4940	4950	4960	4970	4980	4990	5000
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TCTCGTGGTAACTTAGATCACCGAAATCTTGGATTGGTATTGGCTTTATAGAACTAGGATACCGGGTTTAAACGAAAGCACTGGGCAAC										
Consensus	TCTCGTGGTAACTTAGATCaCAGCAAAATCTTGGATTGGTATTGGCTTTATAGAACTAGAAATACCGGGTTTAAACGAAAGCACTGGGCAAc										
	5001	5010	5020	5030	5040	5050	5060	5070	5080	5090	5100
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	CATCAGAAAGCTTCAGGAGATATCTAGACCGGATTTAGTAATGTTTTTTTAGCGAAGTTATGGGCCATGATCTTGGTCTTTTACCTTGT										
Consensus	CATCAGAAAGcCTTCAGGAGATATCTAGAcCGGATTTAGTAATGTTTTTTTAGCGAAGTTATGGGCCATGATCTTGGTCTTTTAcCTTGT										
	5101	5110	5120	5130	5140	5150	5160	5170	5180	5190	5200
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TCCATATTGTTTTATTAATTCACGGCTGGATTTGACCATTGGTAATCAATCCCGCTAAAATGGATCAATCCTTTGATCCGATATGCATTGTG										
Consensus	TCCATaTTGTTTTATTAATTCAcGGCTGGATTTGAcCAATGGTAATCAATCCcGCTAAAATGGATCAATCCTTTGATCCGATATGCATTGTG										
	5201	5210	5220	5230	5240	5250	5260	5270	5280	5290	5300
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TCATTTGCGCCGATCTGTGTAATGCATGGTGGCTTTGTTTTTCGGTATGGCGTGTGTATGGTCCAAATTTTAACTATTGTTGCAAGAAATTTG										
Consensus	TCATTTGCGcCGATCTGTGTAATGCATGGTGGCTTTGTTTTTCGGTATGGCaGTGTGTATGGTCCAAATTTTAACTATTGTTGCAAAAAATTTG										
	5301	5310	5320	5330	5340	5350	5360	5370	5380	5390	5400
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	GAGCTGTTTTAGCGACTATTCTCACGCAATAGCTGTAATATCTTGGTGCATTTTTTGAAGTTTTATGGTTTTTAGAGGATGGTCTTCTCAAAAC										
Consensus	GAGCaGTTTTAGCaACTATTCTCAcGCAATAGCTGTAATAcCTTGGTGCATTTTTTGAAGTTTTATGGTTTTTAGAGGATGGTCTTCTcAAAAc										
	5401	5410	5420	5430	5440	5450	5460	5470	5480	5490	5500
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TATTTTAGGATTAGTACTATGATATCTCTCACAGCTTCTTAAAGATAATCAATATGATCTTACTCGTGAATTAAGCATGATGGGTCATTA										
Consensus	TATTTTAGGATTAGTACTATGATAcCTCTCAcAGCTTCTTAAAGATAATCAATATGATCTTACTCGTGAATTAAGCATGATGGGTCaATTA										
	5501	5510	5520	5530	5540	5550	5560	5570	5580	5590	5600
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TTGGCATGGTGGTAAAGCATACATTTTTCATTATATAGAAATCTTGAAATTTACAAATTTAG-ACGGGACGATGGTATAGTAAATTTAGGCTCTA										
Consensus	TTAGCATGGTGG-TAGTGTAA-TTTTCA-----AAAACTTTAGTTTGCATTTAGACGGGACGATGGTATAGTAAATTTAGGCTCTCA										
	5601	5610	5620	5630	5640	5650	5660	5670	5680	5690	5700
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	TGCCATGTCACACCTGCACGAGAAATTTGTTGCARAGTTATAGAGTTATCTCTTTTGTGCTGATTTTGTCTTGGACATTTGTTTATTATCTCA										
Consensus	TGCCATGTCAcACACCTGCcAGAGAAATTTGTTGCARAGTTATAGAAATATCTCTaTTTGTGCaGATTTTGTCTTGGAcATTTGTTaTTaTTATCTCa										
	5701	5710	5720	5730	5740	5750	5760	5770	5780	5790	5800
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	ACACCATATATGGCATACCTTATATGATCGTTGGCATTCTATGCTTCTATTTGGCTCGACCTCTCGCAAAATCGACCACTATATTTTCATTGA										
Consensus	AcAcCcATATATGGcATAcCTTATATGATCGcTGGcATTCTATGCTcTATTTGGCTCGAcCTCTCGCAAAATCGAcCACTATATTTTCATTAA										
	5801	5810	5820	5830	5840	5850	5860	5870	5880	5890	5900
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	AACAAATTAAGCTTCGAAAAGGATTGTTGCTGATATGCACCTTTGCTTTGGTCTTTTTTACTTTTTCTATGATTATCCTGTTCCAGCCTAGG										
Consensus	AcCAAAcAAcCTTCGAAAAGGATTGTTGCTGATATGCACCTTTGCTTTGGTCTTTTTTAcTTTTCTATGATTATCCTGTTCCAGCaCTAGG										
	5901	5910	5920	5930	5940	5950	5960	5970	5980	5990	6000
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	GCATTTAAATTTCCAAATCTCTAATTAATTTGCTTTCTTAAAACTTGGACCTTATTCACCTTCTAATGATCCAGGGCCGACCGGTAGAAC										
Consensus	AcATTTcAAATTTCCAAATCTCTTAAATTAATTTGCTTTCTTAAAAcTTGGAcCTTATTCAcCTTCTAATGATCCAGGGCCGAcCGGTAGAcAc										
	6001	6010	6020	6030	6040	6048					
p. carinii	----- ----- ----- ----- ----- -----										
p. jirovecii	ACAGACCGGCAAAATCTAATGGAACTATAAATTTGTTTATATACCTGA										
Consensus	AcAGAcCaGcAAATCTAATGGAAcATATAAAATTTGTTTAcATA....										

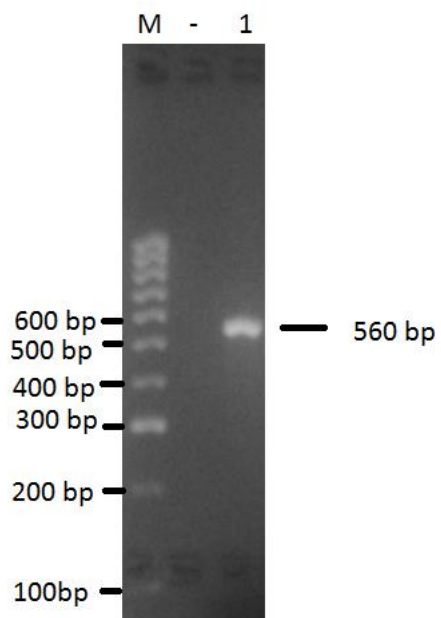
Anexo 3

5'

ACAGCATTATTACGATGATTCTTATCCAAGTCAAACAGATCCATATTATGCTGACAATGGCTATAATAATGCA
GATTTTCACGGGTCTTCATATGCACCCGAAGGGTATGATCATCAGGGAGCTTATCATCCTATGGAATACGGA
CAAGAGTATTATGATGAAGGATATGATAATGGGCAGGTACCATATGATGCACGTGCTTTTGATATGTATTCA
CCATCGGATGATGCATATTATCGTCAAGAAAATGCCTATTATGATTATCCTGCAGATGCATATGCAACGGAT
GTGTATGGTACGTTTTTTATAAAATTCAGAAGTAATTTGTTATTTACTATTTTTGAATTATTAGATCCATAT
GGAATGCCAATTGCTGATCAACACCCTCTCAATATTTCAAGATCATGGGAATTATATGTATAATCGTAAA
GGGAAGCATAGAGGATCATCTGAAGGTTGAGAAGCATTTCGGACTTTACAATGCGTTCTGATATGGCTCGT
GCGGCGGAATTTGATGCATATGGGCGTTTGATGAGCAGTATAGATCGTATGCACCTAGTACAGAATCTCT
TAATCAAATGGCATCTCGACGTGGATATTATCCTGATTCTTCACAAATTTATATACTGGAAACAGATCTTCT
GGAGCAAGCACTCCTGTTTATGGCATGGAATATAATCAAGCTGCTATGATGACATCAGCAAGGTCTCGTGA
ACCTTATCCAGCATGGACAGCAGAAAACCAAATACCTATCTCAAAGAAGAAATTGAGGATATTTTTATTGA
TCTTACTAACAATTTGGGTTCCAGAGGGATTCTATGCGGAATATGTATGATCATATGATGGTGTCTTTTAGA
TTCTCGTGCTAGTCGAATGACACCTAATCAGGCTCTTCTTCTCCATGCAGATTATTTGGTGGGGACAAT
GCAAATTATAGGAATTGGTATTTGCTGCACAACCTGATTAGATGATGCTGGCNGCNANATANCNGAAGG
NGGTAATTGGGTATNTGCAAAACAACTTTATCTGGAATTTTCAATCTCAAAAAATACAGCGGCTAAAG
ATNTCTACAAGCTCTTGAAGTGATAATCCTTTAGAACTCGCATTATATCGTTGGAAGACTAAATGTAGTC
AAATGAGTCAATATGATCGAGCTAGAGAATTGGCACTTTATTTACTTTGCTGGGGTGAAGCAAATCAAGTTC
GATTTACTCCAGAGTGCCTTTGTTTCATTTTTAAATGTGCTAATGATTATCTCAATTCTCCACAATGCCAGGCA
ATGGTTGAGCCGGTTCCTGAAGGATCATATCTTAATGATATTATTACACCTCTTTATATATATATGCGTGATC
AAGGATATGAAATCATCAATGGGAAGTATGTTGCTGAGCGTGATCATAATAAGATTATTGGTTATGAT
GATATTAATCAATTATTTGGTATTCAGAAGGTATTGAACGTATCGTTCCTTTCTGATAAACTCGTATAATTG
ATTTGCCTCCTGAGCAACGGTATCTTAGACTTAAAGATGTAGTATGGAAAAAGGTATTCTTTAAGACATATC
GTGAAACTCGAAGCTGGTTTCATCTATTTACCAATTTCAATAGAATTTGGATTATTCATATTACTGTGTATTG
GTTCTATACTGCTGCAAATTCACCAACTGTTTATACACATAATTATCAACAATCGCTTGATAACCAGCCGCCT
TTTGCTTATCGTATGAGTGCGGTTAGTTTTGGTGGGGGTGTTGCTTCACTACTAATGATCATTGCTACTTTGG
CTGAATGGGCATATGTTCTCGAAAATGGGCAGGTGCTCAGCATTAAACAAGGCGTCTTTTATTTCTTATTTT
GTTTCTAATCATTAATGTTGCACCTGGTGTATATGTAATAAAATTCGCTCCATGGAAACCGAAGGTCAGTGT
TGTTACGACACTTATAAGTATTATACACTTTTTGATTGCAATGTTTACATTTCTTTTTTTGCAATCATGCCTTT
AGGAGGCCTGTTTGGGAATTATTTATACAAAAAACACGTCGTTATGTTGCAAGTCAAACCTTTACAGCTAA
TTTTGCTAAATTAAGGAAATGATTATGGCTCAGTTATGGCCTTTGGATAGCAGTATTGCGTGTAAGTTT
GCAGAATCATACTTTTTCTGTCTCTTCTCTGCGAGATCCTATTAGATATCTTAATACCATGACAATAGGACA
TTGTGGCATTGATATCTGGTTCTATTCTTTGCCATATCAGGCCAAAATTACTCTTGAATAATGTATATCA
CTGATCTGGTATTATTCTTTTTGGATACATATTTATGGTATATTATTTGGAATACTATTTGTTCTGTTGCTAGA
TCGTTTTATCTGGGAGTTTCTATATGGACGCTTGGAGAAACATATTTTCGAGGATGCCAAAGAGAAATTTAC
TCTAAAATTTGGCAACAAATGATATGGAATAAAGTATAAACCCAAAGTCCTATTTTACAGGTTTGGAAAT
GCCATTGTTATATCAATGTATCGAGAACATCTTCTGCTATTGATCATGTCCAAAATTAATATATCACCAGG
TATTATTGTGAAATAACAATTAACATTCTTTTTTAATATATTATAGTTTCTTCTGAACAGGAAGGAAAAAG
AACATTAAGAGCACCAACTTTTTTCATATCACAAGAAGATCATTCTTTCAAACCGAATTTTTCTTACATA
GCGAGGCAGAACGTGCTATTTCTTTTTGCTCAATCACTTTCTACACCAATTCCAGAACCTCTCCAGTTGAT
AATATGCCTACGTTTACTGTTCTGTTCCCATATGTTGAAAAGATTTTATATTCTTTGCGAGAAATTATACG

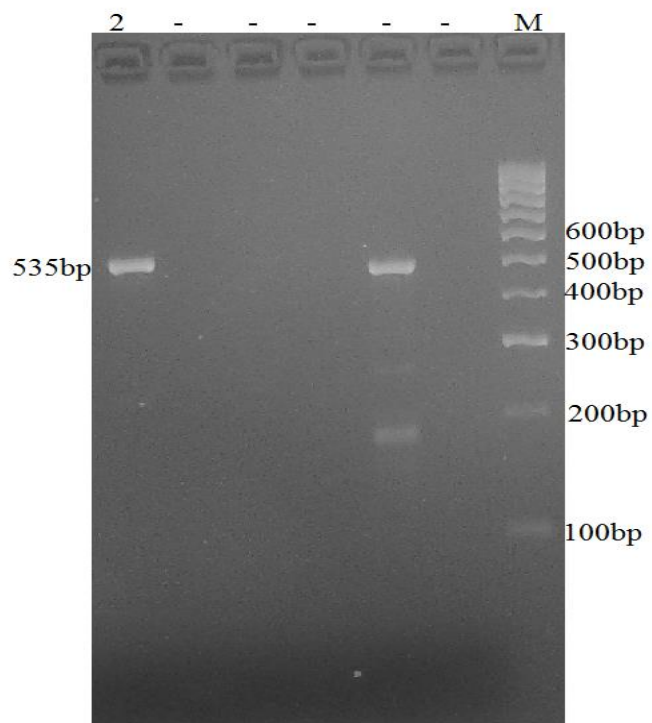
TGAAGATGATCAACTTTCGAGAGTAACACTACTAGAATATCTTAAACAATTGCATCCTGTAGAATGGGATTG
CTTTGTCAAGGATACCAAAAATATTGGCAGAGGAAACTTCTCTTTATAATGGAGGATCATCTTTTGATAAAGA
TGAAAAAGACACAGTAAAAAGCAAAATTGACGATTTACCTTTTTATTGTGTTGGATTCAAATCAGCAGCACC
AGAATATACCTTAAGGACACGTATTTGGGCATCATTGCGTTCTCAAACCTTATACAGAAGCTGTTTCTGGATTT
ATGAACTATTCACGAGCTATTAAGCTTCTTTATCGTGTTGAAAATCCTGATGTTGTTCAAATGTTTGGTGGAA
ATACAGATAAGTTAGAACATGAGTTAGAAAGAATGGCCCGTCGGAAATTCAAATTTGTTATATCAATGCAA
CGATTTTTTAAATTCATAAAGAGGAGCAAGAGAATACGGAATTTCTTCTCGGGCCTATCCAGATCTTCAA
ATTGCATATTTGGATGAAGAGCCGCCTTACATGAAGGAGATGAACCAAAAATATATTCATCTTTAATAGAT
GGATATTCGGAGATTATGGAAAGATGGTAGACGACGACCAAGTTTAGAATTCATTTATCTGGTAATCCTA
TTCTTGGTGACGGTAAAAGTGATAATCAAATCATGCAATCATATTTACCGTGGAGAATATATTCAACTTAT
CGATGCTAATCAAGATAATTATTTGGAAGAATGTTTAAAATTCGTTTCAGTTTTAGCAGAATTTGAAGAAAT
GTCCCACTAGAAGAATTTCCATATAATCCAAATGAAAACCTCTAAAGTTAAACAATCCAGTAGCTATTTTAGGT
GCTCGAGAGTATATTTTTCTGAAAATATAGGTGTTTTAGGTGATGTGGCAGCTGGTAAAGAGCAAACCTTT
GGAACATTATTTGCCCGTACTTTGGCTCAAATTGGCGGAAAACCTCATTATGGTCACCCTGATTTTTAAATG
GACCTTTTATGACTACTAGAGGAGGCGTTTCAAAGCTCAGAAAGGCTTGCATCTTAATGAAGACATATATG
CAGGCATGACTGCACTACTTAGAGGCGGACGTATTAAGCATTGTGAATACTATCAGTGTGGAAAAGGTCGC
GATCTTGGATTTGGATCTATTTTAAATTTACTACAAAAGTTGGTACAGGAATGGGAGAGCAAATGCTTTCC
AGAGAATACTATTATCTTGGAACACAACCTCCATTAGATAGGTTTTATCTTTTTATTATGCTCATCCTGGGT
TCATATTAATAATCTTTTTATTATTCTTTCAGTACAATTACTTATGATTGTCATGATAAATTTGGGATCAATGT
ATAATATTTTACTTATATGTAACCTAGACGTGGGCAACCTATAACGGATCCTTTTCTCCAGTGGGATGTTA
TTCTCTGGCACCTGTGCTTGATTGGATAAACGTAGTATTATTTCTATATTTATTGTTTTTTTTATTGCATTTAT
ACCTCTAGTTGTTCAAGAGTTAACTGAAAGAGGTGTATGGAGGGCCTCTACACGACTTGCTAAACATTTTGG
TTCATTATCGCCTTTATTTGAAGTGTTTGTCTCAAATTTATGCTAATCTTTACTCCAAAATCTTGCAATTTGG
AGGTGCTCGATATATTGGTACTGGTCGTGGATTTGCAACTACTAGAATCCCATTTTCAATACTTTTTTCAAGG
TTTGCTGGTGCATCTATATTTGGGTTACGCACTCTTATTATGCTCTTGTGCAACAGTACTATGTGGAT
ACCTCATTTAGTATACTTCTGGGTTTCAGTGTAGCACTTTGTATANGCCATTTATTTTAAATCCACACCAGT
TTTCATGGACTGATTTCTTGTGGATTATAGAGAATTTATTCGCTGGTTATCTCGTGGTAATTCAGATCTCA
TGCAAAATTCATGGATAGGTTATTGTCGTTTATCCAGAACTAGAATAACAGGATTCAAACGAAAAGCTCTTGG
ACAGCCATCAGAGAACTTTCAAGGTGATATTCCTAGGGCAGGATTTAACAAATGTTTTTTTTAGTGAAGTTAT
CGGGCCATTGATCTTAGTAATTTTGCACCTGTTCCATTTTGTTCATGAATTCACGGCCTGGATTTGAACCAT
TTGGTAAATCAAATCCAGCTCGAAACGGTTCAAATCCTTAAATTCGTATTGCGATTGTTTCATTTGCTCCGAT
TTGTGTTAATGCATTGGTGGCCTTTGTGTTTTTGGTATGGCATGTTGTATGGTCCAATTTTAACTATATGT
TGTAATAAATTTGGAGCAGTTTTAGCAACTATTTCTCATGCAATAGCTGTAATAGTCTTAGTAGCGTTTTTGG
AAGTTTTATGTTTTTLAGAGGGATGGTCTTTCCAAAACCTATTTTAGGATTAGTACTATGATTTCTCTTCAAC
GGGCTTTCTTAAAAATGTTAAACAATAATGATTCTTACTCGTGAATTTAAACATGATGGGTCTAATTTAGCATG
GTGGTATGTGATTTTTTCAAAAACTTTAAGTTTGAACAATTCTAGGACGGGACGATGGTATAGTAATAACTT
AGGCGTTCATGCTATGTCTCAACCTGCTCGAGAATTTGTCTGCAAAGTTATAGAATTATCTCTATTTGCTGCA
GATTTTTGCCTTGGACATTTGTTATTGTTTATCCTCACTCCCATATTGGCTATACCTTATATTGATCGCTGGCA
TTCTATGCTTTTTATTTGGCTTCGACCTTCTCGACAAATTCGACCACCTATATTTTATTAAAGCAGAACAAC
TTCGAAAAAGAATTGTTTCGTCGATATGCAACCTTATTCTTTGGTCTTTTTCTACTTTTTCTTATGATTATCCTTG
TTCCTGCTGTAGGACATTCTAAATTTCCAAAATCTCTTAAACAATATACCTGCTCTTAAAAATTTAGGACTTAT
CAGCCTTCTAATGATCCAAGAGGCGCAACCGGTAGGACTACTAGACCGCAAATTCATGGAACATATAA
GATGTTTACATA 3'

Anexo 4:



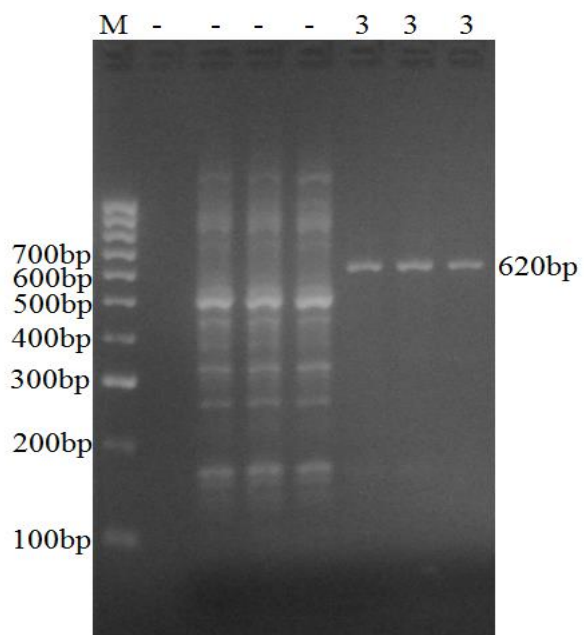
Anexo 4: Fotografia do resultado de gel de PCR da sequência 1. Uma banda única pode ser visualizada aos 560 pares de base quando comparada com a faixa do marcador.

Anexo 5:



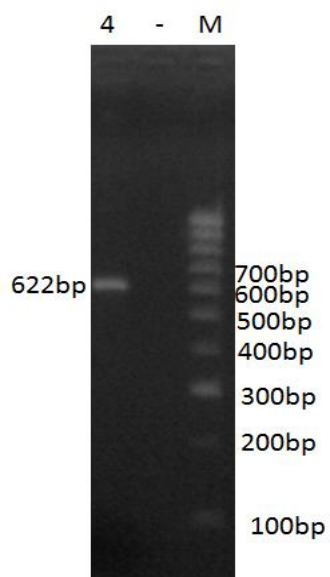
Anexo 5: Fotografia do resultado de gel de eletroforese da PCR da sequência 2 mostrando a banda pretendida de 535 pares de base.

Anexo 6:



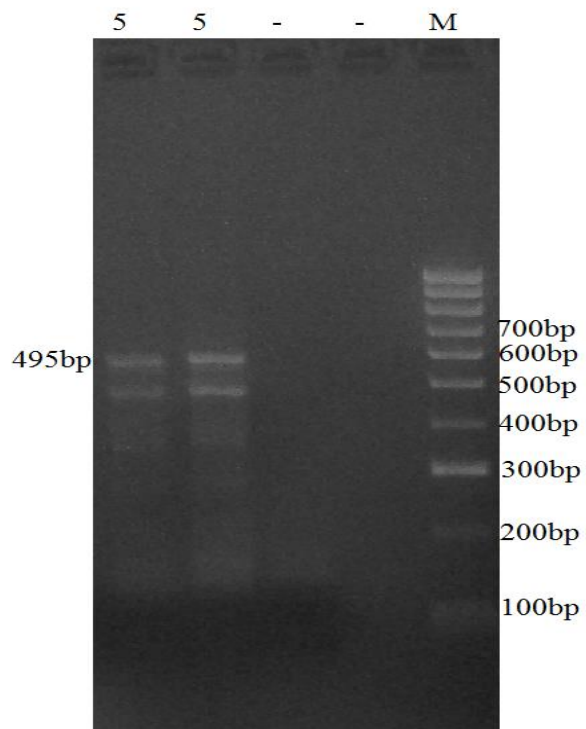
Anexo 6: Fotografia do resultado de gel de eletroforese da PCR da sequência 3 mostrando 3 poços idênticos com a banda pretendida de 620 pares de base.

Anexo 7:



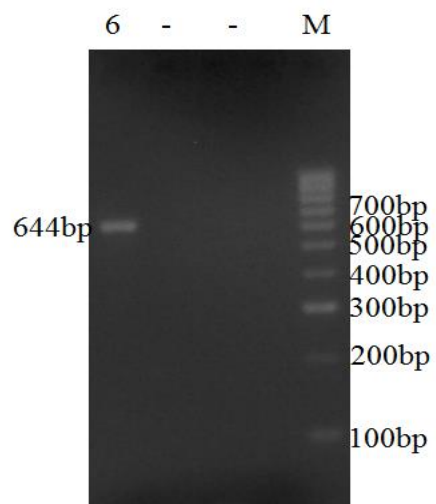
Anexo 7: Fotografia da PCR da sequência 4 mostrando a banda de 622 pares de base relacionado na coluna do marcador. Esta é a faixa de bases pretendidas nesta sequência e portanto pode-se prosseguir.

Anexo 8:



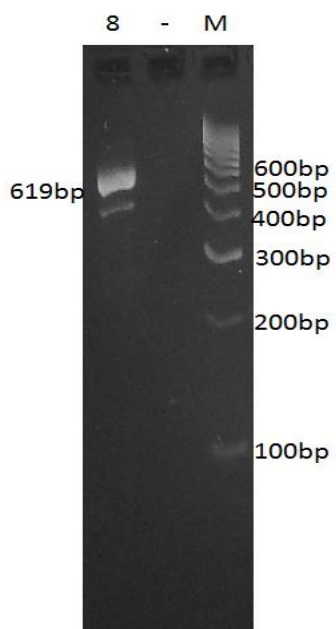
Anexo 8: Fotografia em gel de eletroforese do resultado da reação de PCR da sequência 5. Na imagem pode-se ver duas bandas. Uma delas, marcada na faixa dos 495 bp é a banda pretendida e a outra não conseguiu-se eliminar em otimizações da PCR, mas pode ser aqui descartada.

Anexo 9:



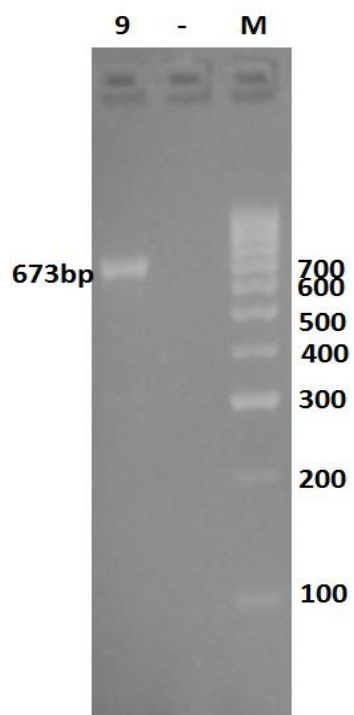
Anexo 9: Fotografia do resultado de gel de eletroforese da PCR da seqüência 6 mostrando a banda pretendida de 644 pares de base.

Anexo 10:



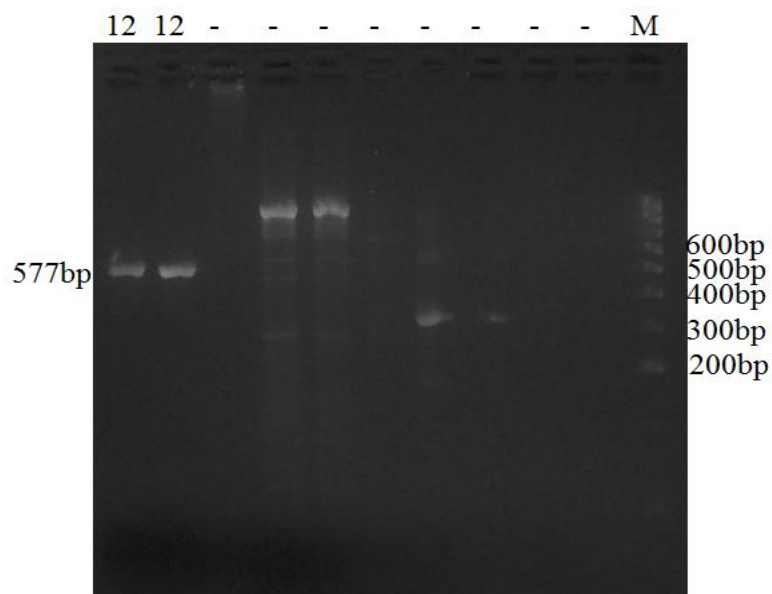
Anexo 10: Fotografia em gel de eletroforese do resultado da reação de PCR da sequência 8. A banda maior, em destaque, é a pretendida para amplificação desta sequência e, portanto, menosprezou-se a outra enviando a amostra para sequenciamento.

Anexo 11:



Anexo 11: Fotografia do resultado de gel de eletroforese da PCR da sequência 9 mostrando a banda pretendida de 673 pares de base.

Anexo 12:



Anexo 12: Fotografia em gel de eletroforese do resultado da reação de PCR da sequência 12. Os dois primeiros poços do gel nos mostram a banda pretendida como resultado da amplificação desta sequência.

Anexo 13:

NACAGCATTATTACGATGATTCTTATCCAAGTCAAACAGATCCATATTATGCTGACAATGGCTATAATAATG
CAGATTTTCACGGGTCTTCATATGCACCCGAAGGTATGATCATCAGGGAGCTTATCATCTATGGAATACG
GACAAGAGTATTATGATGAAGGATATGATAATGGGCAGGTACCATATGATGCACGTGCTTTTGATATGTAT
TCACCATCGGATGATGCATATTATCGTCAAGAAAATGCCTATTATGATTATCCTGCAGATGCATATGCAACG
GATGTGTATGGTACGTTTTTTATAAAATTCAGAAGTAATTTGTTATTTACTATTTTTGAATTATTAGATCCA
TATGGAATGCCAATTGCTGATCAACACCCTCTCAATATTTTCAAGATCATGGGAATTATATGTATAATCGTA
AAGGGAAGCATAGAGGATCATCTGAAGGTTCAGAAGCATTTTCCGACTTACAATGCGTTCTGATATGGCT
CGTGCGGCGGAATTTGATGCATATGGGCGGTTTGATGAGCAGTATAGATCGTATGCACCTAGTACAGAATC
TCTTAATCAAATGGCATCTCGACGTGGATATTATCCTGATTCTTCACAAATTTATATACTGGAAACAGATCT
TCTGGAGCAAGCACTCCTGTTTATGGCATGGAATATAATCAAGCTGCTATGATGACATCAGCAAGGTCTCGT
GAACCTTATCCAGCATGGACAGCAGAAAACCAAATACCTATCTCAAAGAAAGAAATTGAGGATATTTTTATT
GATCTTACTAACAAATTTGGGTTCCAGAGGGATTCTATGCGGAATATGTATGATCATATGATGGTGCTTTTA
GATTCTCGTGCTAGTCGAATGACACCTAATCAGGCTCTTCTTTCTCCATGCAGATTATATTGGTGGGGACA
ATGCAAATTATAGGAATTGGTATTTTGTGTCACAACCTGATTTAGATGATGCTGNNTTCTNNTTTTCAATCTCA
AAAAATACAACGGCTAAAGATATCCTACAAGCTCTTGAAAGTGATAATCCTTTAGAATCTGCAATATATCG
TTGGAAGACTAAATGTAGTCAAATGAGTCAATATGATCGAGCTAGAGAATTGGCACTTTATTTACTTTGCTG
GGGTGAAGCAAATCAAGTTGATTTACTCCAGAGTGCCTTTGTTTCATTTTTAAATGTGCTAATGATTATCTC
AATTCTCCACAATGCCAGGCAATGGTTGAGCCGTTCTGAAGGATCATATCTTAATGATATTATTACACCTC
TTTATATATATATGCGTGATCAAGGATATGAAATCATCAATGGGAAGTATGTTTCGTCGTGAGCGTGATCATA
ATAAGATTATTGGTTATGATGATTAATCAATTATTTGGTATTCAGAAGGTATTGAACGTATCGTTCCTTC
TGATAAAACTCGTATAATTGATTTGCCTCCTGAGCAACGGTATCTTAGACTTAAAGATGTAGTATGGAAAAA
GGTATTCTTTAAGACATATCGTGAAACTCGAAGCTGGTTTCATCTATTTACCAATTTCAATAGAATTTGGATT
ATTCATATTACTGTGTATTGGTTCTATACTGCTGCAAATTCACCAACTGTTTATACACATAAATTATCAACAATC
GCTTGATAACCAGCCGCTTTTGTCTATCGTATGAGTGCAGTTAGTTTTGGTGGGGGTGTTGCTTCACTACT
AATGATCATTGCTACTTTGGCTGAATGGGCATATGTTCCCTCGAAAATGGGCAGGTGCTCAGCATTAAACAA
GCGTCTTTTATTTCTATTTTGTTCATTAATGTTGCACCTGGTGTATATGTAATAAAATTCGCTCCAT
GGAAACCGAAGGTCAGTGTTGTTACGACACTTATAAGTATTATACACTTTTTGATTGCAATGTTTACATTCT
TTTTTTGCAATCATGCCTTTAGGAGGCCTGTTTGGGAATTATTTATACAAAAAACACGTCGTTATGTTGCA
AGTCAAATTTTACAGCTAATTTTGTAAATTAAGGAAATGATTTATGGCTCAGTTATGGCCTTTGGATA
GCAGTATTTGCGTGTAAGTTTGCAGAATCATACTTTTTCTGTCTTTCTCTGCGAGATCCTATTAGATATCT
TAATACCATGACAATAGGACATTGTGGCATTGATATCTGGTTCTATTCTTTGCCATATCAGGCCAAAATT
ACTCTTGAATAATGTATATCACTGATCTGGTATTATTCTTTTTGGATACATATTTATGGTATATTATTTGGAA
TACTATTTGTTCTGTTGCTAGATCGTTTTATCTGGGAGTTTCTATATGGACGCCTTGGAGAAACATATTTTCG
AGGATGCCAAAGAGAATTTACTCTAAAATTTGGCAACAAATGATATGGAAATAAAGTATAAACCCAAAGT
CCTTATTTACAGGTTTGAATGCCATTGTTATATCAATGTATCGAGAACATCTTCTGCTATTGATCATGTCC
AAAAATTAATATACACCAGGTATTATTGTGAAATAACAATTAACATTCTTTTTTAATATATTATAGGTTCTC
TCTGAACAGGAAGGAAAAAGAACATTAAGAGCACCAACTTTTTTCATATCACAAGAAGATCATTCTTTCAA
ACCGAATTTTTCTTCACATAGCGAGGCAGAACGTCGATTTCTTTTTGCTCAATCACTTTCTACACCAAT
TCCAGAACCTCTCCAGTTGATAATATGCCTACGTTTACTGTTCTGTTCCCCATTATGGTGAAGATTTTAT
ATTCTTTGCGAGAAATTATACGTGAAGATGATCAACTTCGAGAGTAACACTACTAGAATATCTTAAACAAT
TGCATCCTGTAGAATGGGATTGCTTTGTCAAGGATACCAAATATTGGCAGAGGAACTTCTCTTTATAATG

GAGGATCATCTTTTGATAAAGATGAAAAAGACACAGTAAAAAGCAAATTGACGATTTACCTTTTTATTGTG
TTGGATTCAAATCAGCAGCACCAGAATATACCTTAAGGACACGTATTTGGGCATCATTGCGTTCTCAAACCT
TATACAGAACTGTTTCTGGATTTATGAACTATTCACGAGCTATTAAGCTTCTTTATCGTGTTGAAAATCCTGA
TGTTGTTCAAATGTTTGGTGGAAATACAGATAAGTTAGAACATGAGTTAGAAAAGATGGCCCCGTCGGAAAT
TCAAATTTGTTATATCAATGCAACGATTTTTAAATTCAATAAAGAGGAGCAAGAGAATACGGAATTTCTTCT
TCGGCCTATCCAGATCTTCAAATTGCATATTTGGATGAAGAGCCGCCTTACATGAAGGAGATGAACCAA
AAATATATTCATCTTAAATAGATGGATATTCGGAGATTATGGAAGATGGTAGACGACGACCAAAGTTTAG
AATTCAATTATCTGGTAATCCTATTCTTGGTGACGGTAAAAGTGATAATCAAATCATGCAATCATATTTTAC
CGTGGAGAATATATTCAACTTATCGATGCTAATCAAGATAATTTTGGGAAGAATGTTTAAAATTCGTTCA
GTTTTAGCAGAAATTTGAAGAAATGTCCCACTAGAAGAATTTCCATATAATCCAAATGAAAACCTAAAGTT
AACAATCCAGTAGCTATTTAGGTGCTCGAGAGTATATTTTTCTGAAAATATAGGTGTTTTAGGTGATGTG
GCAGCTGGTAAAGAGCAAACCTTTTGAACATTATTTGCCGTACTTTGGCTCAAATTGGCGGAAAACCTCAT
TATGGTCACCCTGATTTTTAAATGGACCTTTATGACTACTAGAGGAGGCGTTTCAAAGCTCAGAAAGGC
TTGCATCTTAATGAAGACATATATGCAGGCATGACTGCACTACTTAGAGGCGGACGTATTAAGCATTGTGA
ATACTATCAGTGTGAAAAGGTGCGCATCTTGGATTTGGATCTATTTAAATTTTACTACAAAAGTTGGTAC
AGGAATGGGAGAGCAAATGCTTCCAGAGAATACTATTATCTTGAACACAACCTCCATTAGATAGTTTTT
ATCTTTTTATTATGCTCATCTGGGTTTCATATTAATAATCTTTTTATTATTCTTTTCACTACAATTACTTATGATT
GTCATGATAAATTTGGGATCAATGTATAATTTTTACTTATATGTAAACCTAGACGTGGGCAACCTATAACG
GATCCTTTTCTCCAGTGGGATGTTATTCTCTGGCACCTGTGCTTATTGGATAAAACGTAGTATTATTTCTA
TATTTATTGTTTTTTTTATTGCATTTATACCTCTAGTTGTTCAAGAGTTAACTGAAAGAGGTGTATGGAGGGC
CTCTACACGACTTGCTAAACATTTTGGTTTATTATCGCCTTTATTTGAAAGTGTGTTTTCTCAAATTTATGCTA
ATTCTTTACTCCAAAATCTTGCAATTTGGAGGTGCTCGATATATTGGTACTGGTCGTGGATTTGCAACTACTAG
AATCCCATTTTCAATACTTTTTTCAAGGTTTGTGGTGCATCTATATTTGGGTTACGCACTCTTATTATGC
TCTTGTTTGAACAGTTACTATGTGGATACCTCATTTAGTATACTTCTGGGTTTCAAGTGTGTTTGTGATA
NGCCCATTTATTTTTAATCCACACCAGTTTTCATGGACTGATTTCTTTGTGGATTATAGAGAATTTATTCGCTG
GTTATCTCGTGGTAATTCAGATCTCATGCAAATTCATGGATAGGTTATTGTCGTTTATCCAGAAGTAAATA
ACAGGATTCAAACGAAAAGCTCTTGGACAGCCATCAGAGAACTTTCAGGTGATATTCCTAGGGCAGGATT
TAACAATGTTTTTTTTAGTGAAGTTATCGGGCCATTGATCTTAGTAATTTGTCACTTGTCCATTTTGTTC
TGAATTCACGGCCTGGATTTGAACCATTTGGTAAATCAAATCCAGCTCGAAACGGTTCAAATCCTTAAATC
GTATTGCGATTGTTTCATTTGCTCCGATTTGTGTTAATGCATTGGTGGCCTTTGTGTTTTCGGTATGGCATG
TTGTATGGGTCCAATTTAACTATATGTTGTAAAAAATTTGGAGCAGTTTTAGCAACTATTTCTCATGCAATA
GCTGTAATAGTCTTAGTAGCGTTTTTTGAAGTTTTATGGTTTAGAGGGATGGTCTTTTCCAAAACCTATTTA
GGATTAGTTACTATGATTTCTTCAACGGGCTTTCTTAAAAATGTTAACAATAATGATTCTTACTCGTGAATT
TAAACATGATGGGTCTAATTTAGCATGGTGGTATGTGATTTTTCAAAAACTTTAAGTTTGACAATTCTAGG
ACGGGACGATGGTATAGTAATAACTTAGGCGTTCATGCTATGTCTCAACCTGCTCGAGAATTTGTCTGCAAA
GTTATAGAATTATCTCTATTTGCTGCAGATTTTTGCCTTGGACATTTGTTATTGTTTATCCTCACTCCCATATTG
GCTATACCTTATATTGATCGCTGGCATTCTATGCTTTATTTGGCTTCGACCTTCTCGACAAATTCGACCACC
TATATTTTCATTAAGCAGAAACAACTTCGAAAAAGAAATTGTTTCGTCGATATGCAACCTTATTCTTTGGTCTT
TTTCTACTTTTTCTTATGATTATCCTTGTTCCTGCTGTAGGACATTCTAAATTTCCAAAATCTCTTAAACAATA
CCTGCTCTTAAAAATTTAGGACTTATTACGCTTCTAATGATCCAAGAGGCGCAACCGGTAGGACTACTAGA
CCGGCAAATTCATGGAACATATAAGATGTTTACATA

Anexo 14:

Sequência 1

Forward 5' NNNNNNNNNNN ATGNCTATAA CCTGCAGATG GCACCAAATT 3'
Reverse 5' GCATTATTAC ATGNCTATAA CCTGCAGATG CTCGTGCGGC 3'

Sequência 2

Forward 5' CGTGC GGCGG AACCTTATCC TCTTTCTCTCCATG ATGATGCTGA 3'
Reverse 5' TGAAGGTTCA AACCTTATCC TCA TTTCTCTCCATG 3'

Sequência 3

Forward 5' NTTTTNAATCTCAAAA CTGCAATATAT AAATCAAGTT 3'
Reverse 5' GGAATT TTGGATTTTCTAATATGGATTTGAGAAAAATAAGAAAACAAACCATT
CTCAAAAATTTTCAAAATCTCAAAAAAATACAACGGCTAAAGATATCC CTGCAATATAT
ATCAATTATT 3'

Sequência 4

Forward 5' ATTATTTTGG TGCAAATTCA GCAATCATGC 3'
Reverse 5' TCATAATAAG TGCAAATTCA ATTATACACT 3'

Sequência 5

1962 2204 2429
 | | |
 Forward 5' CAGTGGTTGTT TTTCTGTCTC TCTATATGGA 3'
 1934 2204 2386
 | | |
 Reverse 5' TAAAATTCGC TTTCTGTCTC AATACTATT 3'

Sequência 6

2376 2590 2972
 | | |
 Forward 5' TATTATTTGG GAACA_TC_TTC_TTGCTA_TTGATCATGT_CCA AACAAATTGCA 3'
 2916 2590 2918
 | | |
 Reverse 5' GAAATTATAC GAACA_TC_TTC_TTGCTA_TTGATCATGT_CCA AAATTATACG 3'

Sequência 8

3483 3710 4036
 | | |
 Forward 5' AATATATTCA TGAAGAAATG GACGTATTA 3'
 3445 3710 4002
 | | |
 Reverse 5' GATGAAGAGC TGAAGAAATG CATATATGCA 3'

Sequência 9

3976 4092 4420 4595
 | | | |
 Forward 5' CATATATGCA GATCTATTGN TATTTA AGGTGCTCG 3'
 3941 4092 4420 4535
 | | | |
 Reverse 5' CCTTTATGAC GATCTATTTT TATTTAT TATTTGAAGT 3'

Sequência 12

5469 5692 5994
 | | |
 Forward 5' GCATGGTGGT CATTCTATGC GTTTACATA 3'
 5422 5692 5943
 | | |
 Reverse 5' CAATAATGA CATTCTATGC CCGGTAG 3'